

FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN BIOLOGÍA
TRABAJO FIN DE GRADO
CURSO ACADÉMICO 2017-2018

TÍTULO:

**ESTIMACIÓN DE LA ABUNDANCIA DE VESÍCULAS DE
MEMBRANA EXTERNA EN BACTERIAS**

AUTOR:

DAVID DELGADO GESTOSO

RESUMEN

Las vesículas son unas estructuras esféricas de origen membranoso y tamaño muy reducido, aproximadamente 20-250 nm de diámetro, que son liberadas al medio extracelular por la mayoría de células. Poseen un gran interés debido a sus diversas implicaciones en todos los seres vivos. En el caso de los seres humanos pueden estar asociadas con condiciones patológicas, incluyendo cáncer y enfermedades neurodegenerativas. En las bacterias, las vesículas de membrana externa (OMVs) están implicadas en la comunicación celular y en la patogenicidad bacteriana regulando las respuestas inmunes y reacciones de inflamación. Por estos motivos las vesículas son candidatos prometedores como marcadores de diagnóstico de diversos trastornos de salud o de enfermedades causadas por patógenos. Por lo tanto las expectativas médicas son enormes. Debido a todo ello, el progreso de las herramientas de diagnóstico basadas en vesículas requiere el desarrollo de tecnologías de detección capaces de cuantificarlas en muestras biológicas complejas. Además, la disponibilidad de herramientas para caracterizar OMVs de tamaño nanométrico es igualmente importante en la investigación, donde la elucidación del modo de acción de estas debe correlacionarse tanto con sus propiedades fisicoquímicas como con su concentración en la muestra experimental. Actualmente la mayoría de estudios van dirigidos al análisis del contenido presente en dichas OMVs pero son muy escasos aquellos que se centren en el recuento de OMVs, ya que no hay consenso en la comunidad científica sobre qué metodología emplear que permita llevar a cabo una visualización y recuento de forma rutinaria con una significación estadística suficiente. Por ello, este TFG pretende poner a punto y optimizar una técnica basada en microscopía electrónica que permita visualizar inequívocamente y cuantificar OMVs en una muestra. Para ello, se pusieron a punto dos metodologías, una basada en microscopía electrónica de transmisión (TEM) y otra en microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM). El método basado en TEM resultaría efectivo para visualizar las OMVs aunque subestima la abundancia de OMVs por lo que habría que optimizarlo en investigaciones posteriores. El principal inconveniente de este sería que requiere una gran manipulación y largos tiempos de espera. Los resultados obtenidos basados en el recuento de OMVs por FE-SEM indicarían que esta variante de la técnica sería probablemente la forma más cómoda, rápida y efectiva para la visualización de OMVs. Así, la metodología consistió en filtrar directamente y depositar las OMVs sobre una membrana de polietersulfona (PES) con un tamaño de poro de 10 kDa que se lavaría posteriormente con el buffer HEPES. Tras ello, se visualizarían con el FE-SEM. Sería la mejor técnica ya que prácticamente no aparece contaminación que interfiera en la visualización y únicamente se

visualizan las OMVs. La cuantificación llevada a cabo en el FE-SEM podría considerarse más fiable que la del TEM ya que permite una mejor visualización incluso en planos abiertos y no aparecen cuerpos extraños que interfieran en el recuento. No obstante, se necesitarían investigaciones futuras para confirmar la robustez y fiabilidad del recuento de ambas técnicas.

Palabras clave: ultracentrifugación, TEM, FE-SEM, vesículas de membrana externa (OMVs), abundancia.

ABSTRACT

Vesicles are spheric structures of membranous origin and very small size, approximately 20-250 nm of diameter that are liberated to the extracellular medium by most cells. They have a great interest due to their diverse implications in all living organisms. In humans it can be associated with pathological conditions, including cancer and neurodegenerative diseases. In bacteria, the outer membrane vesicles (OMVs) are involved in cellular communication and in bacterial pathogenicity regulating the immune responses and inflammation reactions. For this reasons, vesicles are promising diagnostic marker candidates for various health disorders or diseases caused by pathogens. While expectations in medical fields are enormous. Because of all this, the progress of vesicles based diagnostic tools calls for the development of sensing technologies capable of quantifying of vesicles in complex biological samples. Also, the availability of nano-sized OMVs characterization tools is equally important in research where the elucidation of the mode of action of OMVs should be correlated both with their physicochemical properties and their concentration in the experimental sample. At present, most of studies analice OMVs cargo but few studies are focus in count OMVs, mainly because there isn't consensus in the scientific community about what methodology to use that allows a visualization and counting to be carried out routinely with enough stadistic significance. For this reason, this TFG aims to tune-up and optimize a technique based on electron microscopy that allows to unambiguously visualize and quantify OMVs in a sample. To do this, two methodologies were tune up, one based on transmission electron microscopy (TEM) and another on field emission scanning electron microscopy (FE-SEM). The method based in TEM would be effective for visualize OMVs although subestimated the abundance of OMVs so it would have to tune-up in future researchs. The main inconvenient is that require a lot manipulation and large waiting times. The obtained results based on counting of OMVs with FE-SEM would indicate that this variant of the technic it would probably be the most comfortable, quickly and effective way to visualization of OMVs. Thus, the methodology consisted of filter directly and deposite the OMVs over a membrane of polyethersulfone (PES) with a size of pore

of 10 kDa that would be washed later with the HEPES buffer. After that, it would be visualized with the FE-SEM. This would be the best technique because don't appear any contamination that difficult the visualization and only OMVs are visualize. The quantification carried out in the FE-SEM could be considered more reliable than that of the TEM since it allows a better visualization even in open planes and no foreign bodies appear that interfere in the counting. However, future research would be needed to confirm the robustness and reliability of the counting of both techniques.

Keywords: ultracentrifugation, TEM, FE-SEM, outer membrane vesicles (OMVs), abundance.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Historia y líneas de investigación de las OMVs	1
2. Estructura de las OMVs	2
3. Formación y contenido de las OMVs	3
4. Funciones de las OMVs	4
5. Aplicaciones de las OMVs	6
6. Métodos de aislamiento de OMVs	7
ANTECEDENTES.....	9
OBJETIVOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. Preparación de cultivos bacterianos	11
2. Recuento de células de <i>E. coli</i> por microscopía y estimación de la abundancia.....	12
2.1. Purificación y fijado de células de <i>E.coli</i>	12
2.2. Recuento y estimación de la abundancia de <i>E.coli</i> mediante microscopía óptica ...	12
2.3. Recuento y estimación de la abundancia de <i>E.coli</i> mediante microscopía electrónica de transmisión	13
2.3.1. Ultracentrifugación de <i>E. coli</i> y optimización de la técnica	14
2.3.2. Tinción por contraste con acetato de uranilo de <i>E. coli</i>	15
2.3.3. Estimación de la abundancia de <i>E.coli</i>	15
3. Recuento de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i> mediante microscopía electrónica de transmisión	16
3.1. Purificación de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i>	16
3.2. Ultracentrifugación de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i>	16
3.3. Tinción por contraste con acetato de uranilo de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i> y visualización en TEM	17
3.4. Estimación de la abundancia de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i> por TEM	17
4. Recuento de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i> mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y de barrido de emisión de campo (FE-SEM)	18
4.1. Purificación de OMVs de <i>V. coralliilyticus</i>	18
4.2. Preparación de las muestras para su visualización en el microscopio electrónico de barrido (SEM) y de barrido de emisión de campo (FE-SEM)	18
4.3. Estimación de la abundancia de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i> por SEM/FE-SEM ..	19
Plan de trabajo	19
RESULTADOS.....	20
1. Abundancia mediante recuento de células de <i>E. coli</i>	20
1.1. Abundancia mediante recuento por microscopía óptica de células de <i>E. coli</i>	20

1.1.1. Células de <i>E. coli</i> fijadas con formaldehído al 4%.....	20
1.1.2. Células de <i>E. coli</i> fijadas con glutaraldehído al 2,5%.....	20
1.2. Abundancia mediante recuento por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de células de <i>E. coli</i>	21
1.2.1. Células de <i>E. coli</i> fijadas con formaldehído al 4%.....	21
1.2.2. Células de <i>E. coli</i> fijadas con glutaraldehído al 2,5%	24
2. Abundancia mediante recuento por Microscopía Electrónica de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i>	26
2.1. Abundancia de OMVs mediante recuento por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	26
2.2. Abundancia de OMVs mediante recuento por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM).....	28
DISCUSIÓN.....	28
1. Comparación de abundancia mediante recuento por microscopía óptica y electrónica.	28
2. Abundancia mediante recuento por Microscopía Electrónica de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i>	30
2.1. Abundancia de OMVs mediante recuento por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	30
2.2. Abundancia de OMVs mediante recuento por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM).....	33
2.3. Comparación de abundancia de OMVs mediante recuento por TEM y FE-SEM	33
CONCLUSIÓN	34
REFERENCIAS.....	36

INTRODUCCIÓN

La mayoría de células de todos los dominios de la vida (Eukarya, Archaea y Bacteria) producen y liberan vesículas nanométricas (<1µm de tamaño) de origen membranoso al medio extracelular (Knox *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2009; Soler *et al.*, 2008; Wolf, 1967).

Estas vesículas conservadas evolutivamente son esféricas y se encuentran formadas por una bicapa de proteolípidos que albergan subconjuntos específicos de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y metabolitos bioactivos (Choi *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2008; Skog *et al.*, 2008).

Se han empleado diversos términos para referirse a las vesículas extracelulares: vesículas de membrana para arqueas y bacterias Gram positivas, vesículas de membrana externa (OMVs) para bacterias Gram negativas, y exosomas y ectosomas (también conocidos como microvesículas) para células de mamíferos (Kim *et al.*, 2013).

Aunque en un principio se creía que dichas vesículas procedían de células lisadas, el progreso reciente en este campo apoya que estas son producidas activamente por células vivas y poseen diversas funciones fisiológicas y patológicas en las comunidades formadas por varias especies (Choi *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2014; Deatherage y Cookson, 2012; Lee *et al.*, 2009). Estas observaciones sugieren un posible papel de las vesículas como forma de comunicación intercelular conservado evolutivamente (Choi *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2014; Deatherage y Cookson, 2012; Lee *et al.*, 2009; MacDonald y Kuehn, 2012; Kulp y Kuehn, 2010).

Las vesículas de membrana externa (OMVs), que derivan de la envoltura celular de bacterias Gram negativas, se han observado y estudiado durante décadas. Se ha contemplado que todos los tipos de bacterias Gram negativas producen OMVs (Kulp y Kuehn, 2010; Schwechheimer *et al.*, 2013; Zhou *et al.* 1998) en una variedad de entornos, incluyendo cultivos de bacterias planctónicas de agua dulce y salada, biofilms, células eucariotas internas y hospedadores de mamíferos (Beveridge *et al.*, 1997; Beveridge, 1999; Biller *et al.*, 2014; Brandtzaeg *et al.*, 1992; Hellman *et al.*, 2000; Hickey *et al.*, 2015).

1. Historia y líneas de investigación de las OMVs

Estas OMVs fueron observadas por primera vez en la década de 1960, mediante estudios de microscopía electrónica sobre estructuras bacterianas en cultivos de *Escherichia coli* (Knox *et al.*, 1966) (Figura 1) y *Vibrio cholera* (Chatterjee and Das, 1967) (Figura 2).

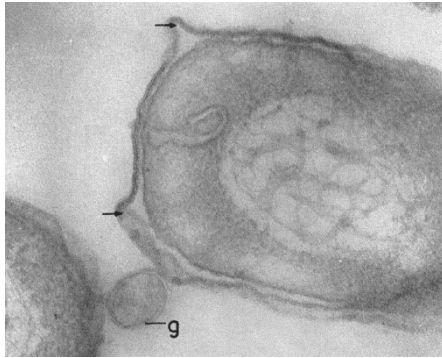


Figura 1. *E. coli* limitada por lisina. Pared celular multicapa formando OMVs (flechas) y OMVs ya formada (g). x135,000 (Knox et al., 1966).

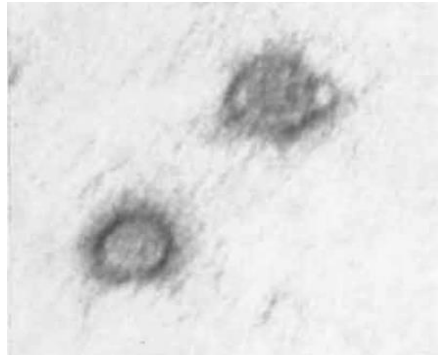


Figura 2. OMVs aisladas de un cultivo acuoso de peptona en fase logarítmica de *Vibrio cholera* y teñidas negativamente con acetato de uranilo. x100,000 (Chatterjee and Das, 1967).

Con el paso de los años, el estudio de OMVs generalmente se ha centrado en la función de estas vesículas, particularmente en lo que se refiere a la patogénesis bacteriana. Recientemente, los análisis genéticos y bioquímicos han llevado a los investigadores a comenzar a resolver los aspectos mecánicos de la producción de OMVs, además de investigar en la producción de estas por bacterias no patógenas. En particular, las OMVs de bacterias no patógenas median funciones como la comunicación celular, las modificaciones de la superficie y la eliminación de componentes no deseados (Deatherage y Cookson, 2012). Además, está quedando patente que múltiples mecanismos pueden conducir a la producción de OMVs en bacterias.

2. Estructura de las OMVs

Como las OMVs derivan de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas, es importante considerar la arquitectura única de este componente bacteriano a fin de comprender los mecanismos implicados en la gemación y desprendimiento de OMVs (Figura 3). La envoltura Gram negativa consiste en dos membranas, la membrana externa y la membrana citoplásmica, y el espacio periplásmico en el medio, que contiene una capa de peptidoglicano (PG) (Silhavy *et al.*, 2010). La membrana externa es una barrera celular exterior bastante inusual, que se compone de una capa interior de fosfolípidos y una capa exterior de lipopolisacárido (LPS). La membrana citoplasmática consiste en una bicapa típica de fosfolípidos que sirve como barrera electroquímica (Silhavy *et al.*, 2010). El periplasma es un entorno oxidativo que promueve el plegamiento de proteínas pero no contiene fuentes de energía en forma de nucleótidos, como ATP o GTP (Kojer y Riemer, 2014). La capa de PG posee forma de red dentro del periplasma dando a las bacterias su forma, además imparte protección contra los cambios osmóticos y el estrés. Las proteínas que envuelven la membrana son solubles (proteínas periplásmicas), estas pueden encontrarse asociadas a la membrana, integradas en esta o

ancladas covalentemente a apéndices lipídicos unidos a cualquiera de las membranas (lipoproteínas) (Figura 3).

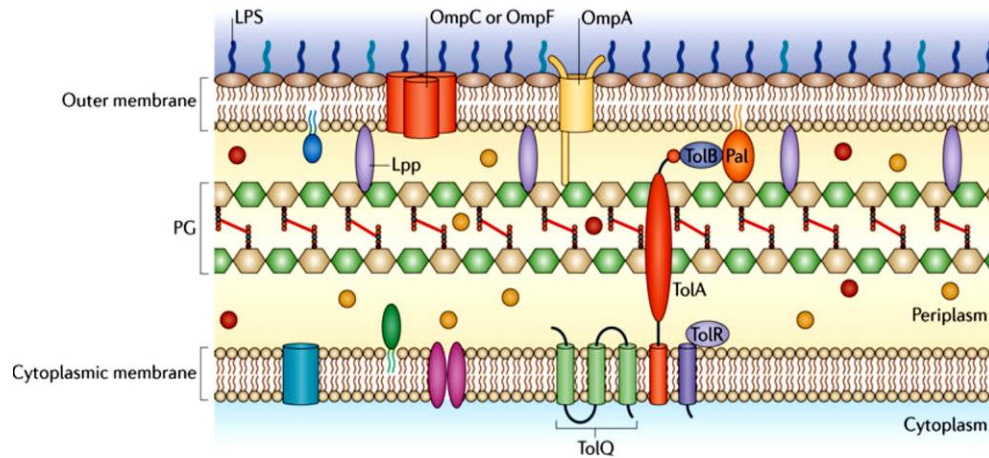


Figura 3. Composición de la envoltura de células Gram-negativas (Schwechheimer y Kuehn, 2015).

3. Formación y contenido de las OMVs

Las OMVs son porciones esféricas de la membrana externa, de aproximadamente 20-250 nm de diámetro, que contienen componentes luminales periplásmicos y que brotan y se desprenden de la célula durante el crecimiento activo, y no como un subproducto de la lisis celular (McBroom *et al.*, 2006), la biogénesis de OMVs (Figura 4) probablemente debe consistir en la disociación de la membrana externa de la capa de petidoglicano subyacente, seguido de fisión sin comprometer la integridad de la envoltura.

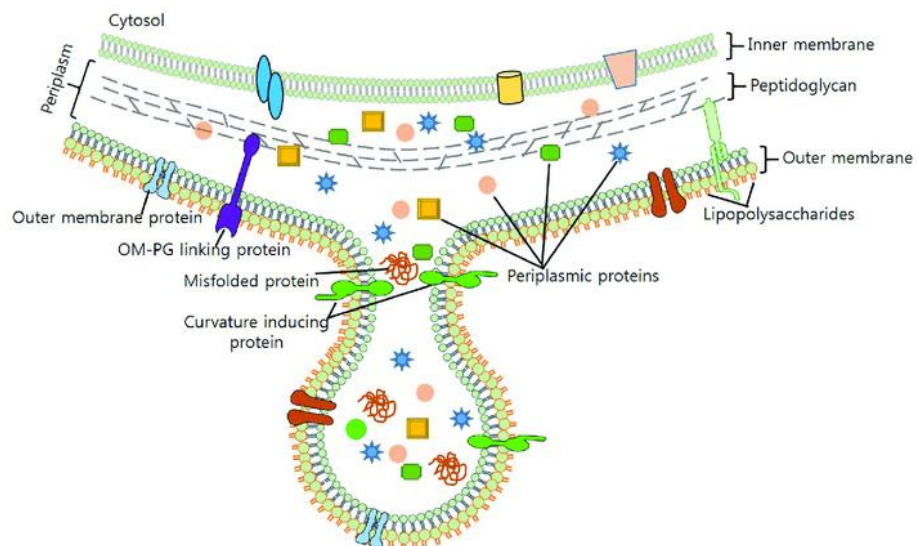


Figura 4. Biogénesis de la producción de OMVs en bacterias. La figura muestra la composición de OMV y la selección de carga (Jan, 2017).

La selectividad del contenido de las OMVs revela que la biogénesis de estas es un proceso deliberado, en lugar de un evento estocástico. Además, los niveles de vesiculación pueden verse alterados por factores como la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, la oxidación, la detección de *quorum* y los antibióticos dirigidos a la envoltura (McBroom y Kuehn, 2007; MacDonald y Kuehn, 2013; Roden *et al.*, 2012; McMahon *et al.*, 2012; Frias *et al.*, 2010; Toyofuku *et al.*, 2013). Además, pueden existir subpoblaciones de OMVs con distintas composiciones dentro de un cultivo bacteriano, aunque la heterogeneidad de las poblaciones de OMVs es algo que aún no se ha explorado con mucha profundidad.

4. Funciones de las OMVs

Se ha determinado que los OMVs tienen diversos roles y funciones, dependiendo de las especies productoras de estas y de las condiciones de cultivo. Esto no es sorprendente, ya que la expresión génica bacteriana, y en consecuencia la composición de la envoltura, es muy variable entre las especies y está influenciada por el entorno bacteriano. Debido a la diversidad de funciones mediadas por OMVs, es importante centrarse en la pregunta de por qué las bacterias las producen. En general, parece que las bacterias pueden utilizar OMVs para mejorar sus posibilidades de supervivencia e inducir cambios dentro de su entorno (McBroom y Kuehn, 2007; Manning y Kuehn, 2011; Maredia *et al.*, 2012; Schwechheimer *et al.*, 2013; Tashiro *et al.*, 2009). Por ejemplo, las OMVs pueden proporcionar factores de virulencia y modular el sistema inmune del huésped durante la patogénesis; pueden ayudar en la adquisición de nutrientes y la protección del nicho ecológico; y pueden ayudar a proporcionar soporte estructural en entornos de múltiples especies, como biofilms (Berleman y Auer, 2013; Ellis y Kuehn, 2010; Kulp y Kuehn, 2010).

Desde una perspectiva biológica, las OMVs tienen varias funciones importantes relacionadas con las interacciones célula-célula, liberación de compuestos y crecimiento bacteriano y supervivencia. En la Figura 5 se muestra una visión general de los roles funcionales de las OMVs. Los detalles se proporcionan en las siguientes secciones.

Interacciones célula-célula

Las OMVs contienen factores de virulencia, señales de comunicación célula-célula, ADN y ARN. Estos contenidos son entregados a células vecinas, incluyendo células bacterianas y hospedadoras. El papel biológico de las OMVs es particularmente relevante en la patogénesis bacteriana, ya que toxinas y compuestos inmunomoduladores están asociados con OMVs que modulan la respuesta inmune del huésped (Ellis y Kuehn, 2010).

Las bacterias poseen diversos métodos para transmitir genes de una célula a otra que no sea descendiente suya, se conoce como transferencia genética horizontal o lateral. Muchos estudios han informado de la presencia de ADN asociado con OMVs (Dorward y Garon, 1990; Schooling *et al.*, 2009). Este ADN está protegido contra la degradación por DNasa, además varias investigaciones han reportado que las OMVs pueden transferir genes (Fulsuldar *et al.*, 2014; Rumbo *et al.*, 2011; Yaron *et al.*, 2000).

Las OMVs también juegan un papel importante en la comunicación bacteriana, las bacterias se comunican entre sí a través de pequeñas moléculas. Las OMVs por tanto también están implicadas en el *quorum sensing* (Mashburn y Whiteley, 2005; Schertzer *et al.*, 2009).

Soporte de crecimiento

Las OMVs pueden servir como fuentes de carbono orgánico para heterótrofos. Las OMVs derivadas de cianobacterias permiten el crecimiento de *Alteromonas* y *Halomonas* cuando se usan OMVs como única fuente de carbono, lo que indica que estas deben considerarse en la red trófica marina y tienen un papel importante en el flujo de carbono del océano (Biller *et al.*, 2014).

Las OMVs también pueden contener enzimas degradativas que permiten digerir polisacáridos, de esta forma pueden proporcionar nutrición a otras especies (Toyofuku *et al.*, 2015).

Transferencia de electrones

Las bacterias pueden utilizar superficies externas, incluidos metales oxidados, en el medio ambiente como aceptores de electrones en lo que se conoce como transporte extracelular de electrones (EET) (Myers y Nealson, 1988). El EET es empleado en células bacterianas para generar electricidad (Rabaey y Rozendal, 2010). Cómo está mediado el transporte de electrones extracelulares a larga distancia en bacterias es una cuestión clave, y varios estudios han reportado filamentos conductivos extracelulares conocidos como nanocables. En *Shewanella oneidensis*, estos nanohilos están asociados con las OMVs (Pirbadian *et al.*, 2014).

Papel defensivo

Debido a que las OMVs en bacterias Gram negativas derivan de la membrana externa celular, funcionan como señuelos contra amenazas externas. Estas pueden unirse a fagos (Manning y Kuehn, 2010), lo que permite a las células escapar de estos, aumentando la supervivencia celular. Los fagos unidos a OMVs muestran una densidad de tinción de la cápside alterada, lo que sugiere que su ADN es inyectado en las OVMs (Biller *et al.*, 2014). También se ha observado

que las OMVs pueden ser útiles para evitar antibióticos dirigidos a la membrana catiónica, como la polimixina (Manning y Kuehn, 2010).

Eliminación de sustancias

Por último, las OMVs también sirven como un sistema de eliminación de sustancias innecesarias que se acumulan en las células microbianas (Toyofuku *et al.*, 2015).

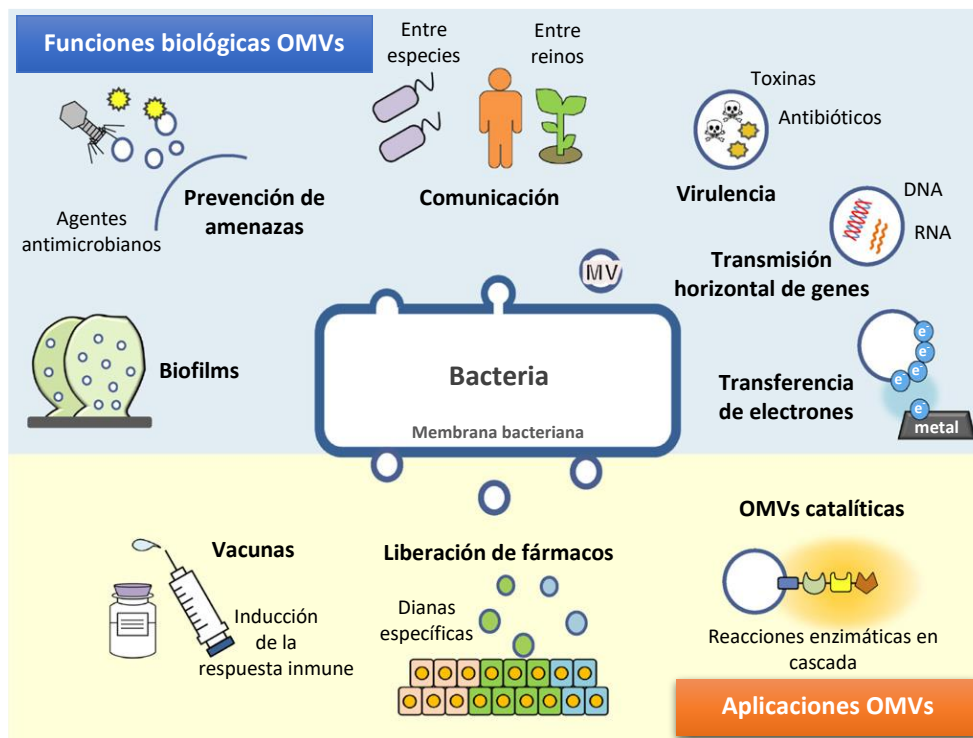


Figura 5. Funciones biológicas de las OMVs y sus aplicaciones (Toyofuku *et al.*, 2015 modificado).

Debido a su reducidísimo tamaño dentro de la escala nanométrica, son técnicamente difíciles de detectar, analizar y estudiar (Konoshenko *et al.*, 2018). A pesar de la dificultad técnica, el estudio de vesículas contribuye a nuestra comprensión de la fisiología bacteriana básica, así como a nuestra capacidad para diseñar vesículas para llevar a cabo funciones deseables como inducción de la respuesta inmune en vacunas, liberación de fármacos en dianas específicas o como centros catalíticos que permitan reacciones enzimáticas en cascada (Toyofuku *et al.*, 2015).

5. Aplicaciones de las OMVs

El conocimiento sobre el contenido y la biogénesis de las OMVs ha llevado al diseño de estas para diversas aplicaciones.

Mediante técnicas de ingeniería genética las células bacterianas se han manipulado para dirigir específicamente las proteínas hacia el interior o la superficie exterior de las OMVs.

Estas técnicas permiten añadir a las OMVs actividades enzimáticas, alterar la inmunogenicidad de estas y modificar la adhesión a la célula diana.

También se puede lograr cargar las OMVs con sustancias diferentes a proteínas mediante electroporación.

Vacunas

La inmunogenicidad reportada en muchos estudios sugiere que las OMVs pueden usarse como vacunas. Además, la administración de toxinas asociadas con OMVs tiene ventajas sobre la administración de toxinas puras y, por lo general, es más eficaz.

Una vacuna de OMVs de *Neisseria meningitidis*, Bexsero (Novartis) (Vernikos y Medini, 2014), ha sido aprobada para su uso en Europa. De hecho, solo las vacunas de OMVs tienen eficacia comprobada contra *N. meningitidis* sero grupo B.

Además, varias proteínas inmunodominantes pueden empaquetarse en OMVs para mejorar la cobertura de la vacuna (van den Dobbelen *et al.*, 2007). En definitiva, numerosos estudios han demostrado las propiedades inmunogénicas de las OMV mostrando su potencial como vacunas (Bottero *et al.*, 2013; Camacho *et al.*, 2011; Nieves *et al.*, 2011).

Administración de compuestos como fármacos

La ventaja de administrar compuestos en el interior de OMVs en comparación con la administración en forma soluble, es que la carga puede viajar largas distancias protegida contra proteasas y anticuerpos del huésped (Aldick *et al.*, 2009; Bomberger *et al.*, 2009; Gujrati *et al.*, 2014). Además, múltiples compuestos pueden ser empaquetados en OMVs, permitiendo efectos sinérgicos (Lindmark *et al.*, 2009). También, algunas OMVs están asociados con adhesinas, que mejoran la unión de estas con las células diana y pueden permitir la administración dirigida a tipos celulares específicos (Ricci *et al.*, 2010; Voegel *et al.*, 2009).

6. Métodos de aislamiento de OMVs

Para el estudio y posterior análisis de las OMVs es necesario previamente aislarlas de las células y del resto de elementos presentes en el cultivo.

Los métodos tradicionales utilizados para su aislamiento utilizan las propiedades de las OMVs, como el tamaño y su densidad de flotación. Estos métodos son la ultracentrifugación (Théry *et al.*, 2006), la microfiltración (Taylor y Shah, 2015) y la filtración en gel (Taylor *et al.*, 2011). Los métodos basados en la solubilidad y/o agregación de las OMVs aparecieron algo más tarde, donde destacan la precipitación con polietilenglicol (Gámez-Valero *et al.*, 2016), protamina (Deregibus *et al.*, 2016) y acetato de sodio (Brownlee *et al.*, 2014). Además, han

aparecido recientemente numerosos métodos para el aislamiento de las poblaciones de OMVs que se basan en las interacciones altamente específicas de las moléculas presentes en la superficie de las OMVs o tecnologías de microfluidos (He *et al.*, 2014; Kanwar *et al.*, 2014; Kreimer *et al.*, 2015; Santana *et al.*, 2014). Cada uno de estos métodos tiene sus propias ventajas y defectos, que se han de tener en cuenta a la hora de planificar un experimento.

Ultracentrifugación

En dicho experimento se empleará la ultracentrifugación como método de aislamiento. En esta se realiza la separación de las partículas según su densidad de flotación mediante centrifugación. Donde en una primera etapa, las partículas con una alta densidad de flotación sedimentan, tales como células, desechos celulares, cuerpos apoptóticos y agregados de biopolímeros. Las OMVs presentes en el sobrenadante resultante se sedimentan por ultracentrifugación a $>100.000\text{ g}$ ($100.000\text{-}200.000\text{ g}$) durante 2 h (Konoshenko *et al.*, 2018). Posteriormente se requiere el lavado de estas, se ha de tener en cuenta que las etapas adicionales en la purificación de OMVs como el lavado no solo aumentan la pureza de estas sino que también disminuyen su cantidad (Livshits *et al.*, 2015). En particular se ha demostrado que el lavado disminuye el rendimiento de OMVs (pérdidas causadas por la sedimentación incompleta y la agregación en gránulos) (Webber y Clayton, 2013).

No obstante, todavía no existe un protocolo unificado para la eliminación de células y restos celulares al analizar diferentes fluidos biológicos.

En cuanto a la eficiencia del aislamiento de OMVs por centrifugación depende de muchos factores, como la aceleración (g), el tipo de rotor y sus características, y la viscosidad de la muestra (Cvjetkovic *et al.*, 2014). En consecuencia, estos parámetros deben tenerse en cuenta al usar y ajustar el protocolo de ultracentrifugación para obtener OMVs lo más purificadas posibles y estandarizar los resultados.

Se ha demostrado que la ultracentrifugación permite aislar la fracción de OMVs con un tamaño de 20 a 250 nm.

Las mayores desventajas de la ultracentrifugación son principalmente su larga duración y la necesidad de equipos costosos, que limitan su eficacia y uso en estudios clínicos y para el diagnóstico. Por otro lado, las ventajas de la ultracentrifugación incluyen su uso para el aislamiento de OMVs de grandes volúmenes de fluidos biológicos, requiere un conjunto relativamente pequeño de reactivos y consumibles, y no hay impactos en las OMVs excepto la fuerza gravitatoria y el pipeteo (ya que no hay productos químicos que puedan potencialmente interferir con el análisis posterior). Debido a estas ventajas y su buena reproducibilidad, la ultracentrifugación es el método más utilizado para el aislamiento de OMVs y ha sido utilizado

para estudiar las vesículas derivadas de sobrenadantes de cultivos celulares y fluidos biológicos (Campoy *et al.*, 2016; Crescitelli *et al.*, 2013; Ismail *et al.*, 2013; Klimentová and Stulík, 2015).

ANTECEDENTES

Uno de los mayores obstáculos del análisis de las OMVs es la dificultad para establecer métodos estandarizados para medirlas, principalmente debido a su reducido tamaño. Esto incluye problemas en la sensibilidad de la medición de partículas submicrométricas, así como de especificidad cuando se utiliza el tamaño como criterio de identificación principal. Existen varias técnicas ópticas y no ópticas para la evaluación cuantitativa y cualitativa de OMVs donde se incluyen la citometría de flujo, la dispersión de luz dinámica (DLS), el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), la microscopía electrónica (EM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM) (Pasalic *et al.*, 2016).

La citometría de flujo es el método más empleado para el recuento y análisis cualitativo de OMVs. Las ventajas que presenta incluyen disponibilidad, rapidez y oportunidades para explorar múltiples parámetros utilizando combinaciones de colorantes y fluoróforos. Entre las limitaciones directas se incluyen, incapacidad para resolver ciertas estructuras de muy reducido tamaño (György *et al.*, 2011), señales de falsos positivos por detección de agregados de proteínas (Gyorgy *et al.*, 2010) y detección de "enjambre", que es el registro de múltiples vesículas identificadas simultáneamente como señales de un solo evento (Nolan y Stoner, 2013; Van Der Pol *et al.*, 2012).

Debido a estas limitaciones, la cantidad de OMVs obtenidas en una muestra puede no ajustarse a la concentración real de estas, lo que hace necesario calibrar el método de detección. Para ello una forma de hacerlo, y así evitar que se produzcan subestimaciones o sobrestimaciones durante la cuantificación por citometría de flujo, sería paralelamente con la misma muestra, realizar una preparación para EM a partir de la cual obtener la concentración de OMVs.

En cuanto a formas de expresar la concentración de OMVs, estas pueden expresarse como OMVs/mL como es el caso de este estudio. Pero existen otras formas de expresar la abundancia de OMVs donde se incluyen la cuantificación de proteínas mediante algunos de los métodos bien conocidos, como Bradford (Bradford, 1976) y Lowry (Lowry *et al.*, 1951), o mediante análisis de geles de separación. Por otro lado, la cuantificación de fosfolípidos es otra forma de expresar la cantidad de OMVs, donde existen diferentes métodos como por ejemplo ELISA usando antisuero anti-LPS.

OBJETIVOS

En este TFG, se pretende poner a punto y optimizar una metodología que permita llevar a cabo una estimación de la abundancia de OMVs presentes en una muestra biológica.

Para ello, basándose en la bibliografía existente, se ha optimizado el recuento de OMVs mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de barrido de emisión de campo a partir de OMVs producidas por *Vibrio coralliilyticus*.

Dado que el trabajo y estudio con OMVs, debido a su tamaño nanométrico es altamente complejo, muchos de los ensayos primeramente se pondrán a punto con cultivos de células de *E.coli* que servirá para calibrar y validar algunas de las técnicas puestas a punto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los microorganismos elegidos son *Escherichia coli* cepa B por tratarse de un microorganismo conocido y muy estudiado, del que se conoce su tamaño y requerimientos; además dicha cepa es de crecimiento rápido. El otro microorganismo por el que se ha optado para el estudio de OMVs es *Vibrio coralliilyticus*, patógeno del coral, que produce una gran cantidad de estas.

Por otro lado, los materiales empleados son:

- Resina epoxi (Epofix™; Electron Microscopy Sciences Ref. 1232)
- Pipetas monocal manual (Pipet-Lite XLS+, Rainin)
- Caldo nutritivo o *Nutrient Broth*
- Caldo LB al 3% NaCl
- Formaldehído al 4% y 2,5%
- Buffer fosfato salino (PBS) 1X
- Tampón HEPES 50 mM (Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico)
- Agua ultrapura (mQW)
- Marcador fluorescente DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol)
- Acetato de uranilo 2%
- Filtros de 0,22 µm (MilliPore GTTP02500)
- Filtros de jeringa de 0,22 µm (Millex-GP SLGP033RS)
- Tubos eppendorf con filtro de polietersulfona (PES) con un tamaño de poro de 10 kDa (Nanosep® 10k Omega, mfr. no. Pall OD010C33)
- Papel de sellado (PARAFILM®, ALDRICH BR701605)
- Pegamento (ZHANLIDA® B-7000)
- Rotulador repelente de líquido (Liquid Blocker Super pap pen, Daido Sangyo Co. Ltd. Tokio, Japan)

- Tubos de polipropileno para ultracentrífuga (Beckman Coulter, Ref. 331372)
- Rejillas TEM de cobre 300 Mesh (Electron Microscopy Sciences, Ref. FCF300-Cu)
- Soporte de aluminio para muestras SEM/FE-SEM
- Microcentrífuga (Spectrafuge™ 24D, Ref. C2400)
- Centrífuga refrigerada (Centurion Scientific K3 Series, Ref. K241R. Con rotor BRK5308)
- Ultracentrífuga refrigerada (Beckman Coulter Optima XL-100K con rotor SW41Ti)
- Microscopio de fluorescencia (Leica DM4000 B)
- Microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1400 Plus)
- Microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-840)
- Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (ZEISS Merlin VP Compact)
- Agitador tipo vórtex (Fisherbrand™ ZX3)

1. Preparación de cultivos bacterianos

Las células bacterianas analizadas fueron de *Escherichia coli* cepa B y *Vibrio coralliilyticus*. Para cada especie por lo tanto se realizó un medio de cultivo líquido diferente.

El medio empleado para el crecimiento de *E. coli* B fue caldo nutritivo o *Nutrient Broth*. Para su preparación se disolvió tal como indicaba el fabricante, 4 gramos de medio en 500 mL de agua destilada y se comprobó mediante un pH-metro que el pH se encontrase a $6,8 \pm 0,2$ (25°C).

Por otro lado se procedió a preparar el medio de *V. coralliilyticus*, caldo LB al 3% NaCl. Se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante disolviendo en un volumen de 600 mL de agua destilada, 30 gramos de NaCl, 10 gramos de Triptona, 5 gramos de extracto de levadura y finalmente se enrasó hasta 1 litro con agua destilada.

Ambos medios se distribuyeron en diferentes frascos autoclavables adecuadamente identificados con el medio que contenían y la fecha de elaboración.

Por último se autoclavaron durante 20 minutos y tras ello se almacenaron hasta su uso.

Para el cultivo de *E.coli*, en esterilidad bajo llama, se inocularon 100 mL de Nutrient Broth con 1 mL de un inóculo de *E. coli* B almacenado a 4°C y se incubó 3 días a 37°C a 150 rpm de agitación junto con un blanco que permitiese comprobar que el medio de cultivo no se encontrase contaminado.

En el caso de *V. coralliilyticus*, se inoculó 1 mL de este en 100 mL de LB 3% NaCl y se incubaron *overnight* a 30°C a 120 rpm de agitación, junto con un blanco.

2. Recuento de células de *E. coli* por microscopía y estimación de la abundancia

2.1. Purificación y fijado de células de *E.coli*

Se realizaron fijaciones de células de *E. coli* con diferentes fijadores químicos para comprobar cual podría dar mejores resultados y permitiese una mejor visualización de las células para ser aplicado posteriormente en las OMVs.

El cultivo de *E. coli* se fijó con formaldehído al 4%, ya que este fija las células y permite una buena visualización en microscopía óptica, hasta un volumen total de cultivo fijado de 10 mL y se incubó durante 4 horas a 4°C (Epstein y Rossel, 1995).

Por otro lado, también se fijaron 6 mL de cultivo, previamente centrifugado y lavado 2 veces con Buffer fosfato salino (PBS) 1X filtrado previamente con un filtro de jeringa de 0,22 µm, con glutaraldehído al 2,5% puesto que es ideal para microscopía electrónica y da mejores detalles en general citoplasmáticos y nucleares (Carson y Christa, 2012). Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la centrifugación y el lavado se centrifugó a 13.000 g durante 30 minutos.

Para disponer únicamente de las células y eliminar cualquier residuo, resto o sustancia que pudiese encontrarse junto a las células, se procedió con la realización de una serie de lavados con PBS 1X también filtrado con un filtro de jeringa de 0,22 µm.

En el cultivo fijado con formaldehído al 4% se emplearon dos tubos eppendorf con filtro de membrana de polietersulfona (PES) y un tamaño de poro de 10 kDa (Nanosep® 10k Omega) y en cada uno de ellos se procedió de la siguiente forma.

Se introdujeron 500 µL del cultivo de *E. coli* fijado y se centrifugó durante 30 minutos a 4.800 g, hasta hacer pasar todo el volumen a través del filtro y se descartó el líquido que había pasado. Posteriormente se volvió a repetir dicho paso para de esta forma lavar un total de 1 mL de células. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X (0,22 µm) de igual forma que se procedió con el cultivo. Tras ello, se resuspendieron las células en 500 µL de PBS 1X (0,22 µm) con ayuda de un agitador tipo vórtex y tras ello se ajustó el volumen hasta 1 mL con PBS 1X (0,22 µm) en un nuevo tubo.

En cuanto al cultivo fijado con glutaraldehído al 2,5%, se realizaron 2 lavados a 1,5 mL de cultivo fijado en tubos eppendorf con PBS 1X (0,22 µm) y tras ello se resuspendieron las células con 1,5 mL de agua ultrapura (mQW), para ello se centrifugó a 13.000 g durante 30 minutos.

2.2. Recuento y estimación de la abundancia de *E.coli* mediante microscopía óptica

Para visualizar las células se realizó una tinción con DAPI, fluorocromo que se intercala entre el DNA y permite visualizar la presencia de células. Se realizaron dos diluciones. La primera de

ellas fue una dilución 1/10, para ello a 100 µL de células fijadas se les añadió 900 µL de PBS 1X (0,22 µm). La otra dilución se trataba de una dilución 1/100, por ello en este caso a 100 µL del cultivo fijado se le incorporaron 9,9 mL de PBS 1X (0,22 µm).

De cada dilución fue filtrado 1 mL con un filtro de 0,22 µm (MilliPore GTTP02500) utilizando una columna de filtrado y vacío. Tras ello, se extrajo el filtro de la columna y en una placa Petri se dejó secar sobre papel de filtro y se marcó en que cara se encontraban las células.

Una vez seco, se recortó un fragmento del mismo y se realizó una muesca que facilitase la identificación de la cara en la que se encontraban las células.

A continuación se procedió a realizar la tinción, para ello se añadieron 20 µL de DAPI y se incubó 1 minuto en oscuridad. Tras ello se realizó durante 1 minuto un lavado con agua mQ filtrada previamente con un filtro de jeringa de 0,22 µm. Tras ello, se lavó con Etanol puro durante 1 minuto. Ambos lavados fueron realizados en oscuridad y a temperatura ambiente. Por último, se procedió con el montaje para su visualización en el microscopio óptico de fluorescencia, por lo que se puso el filtro sobre un portaobjetos y se añadieron 15 µL de citifluor. Finalmente se cubrió con un cubreobjetos y se selló con laca de uñas.

Una vez teñidas las muestras, se procedió a la visualización de estas mediante el microscopio óptico de fluorescencia (Leica DM4000 B) y se realizaron un mínimo de 10 fotografías.

Posteriormente mediante una plantilla se procedió al recuento usando un área de 100 µm².

Finalmente para obtener la abundancia se empleó la siguiente fórmula, donde el área del filtro es de 2x10⁸ µm².

$$N^{\circ} \text{ céls/mL} = \frac{\text{Media células}}{\text{Área observada}} \times \frac{\text{Área del filtro}}{1 \text{ filtro}} \times \frac{1 \text{ filtro}}{\text{Volumen filtrado de muestra}}$$

2.3. Recuento y estimación de la abundancia de *E.coli* mediante microscopía electrónica de transmisión

Para poder visualizar correctamente y permitir su recuento en el microscopio electrónico, antes de centrifugar, es necesario diluir con PBS 1X las células. Por este motivo se procedió a realizar dos diluciones. Se hizo una dilución 1/10, a 200 µL de células fijadas y lavadas se les añadió 1,8 mL de PBS 1X (0,22 µm). Y por otro lado, una dilución 1/100, a 20 µL del cultivo fijado y lavado se le incorporaron 1,98 mL de PBS 1X (0,22 µm). De esta forma las células fueron ajustadas a una concentración de 10⁶ y 10⁷ células/mL.

2.3.1. Ultracentrifugación de *E. coli* y optimización de la técnica

Para conseguir que las células se adhieran y distribuyan de forma uniforme a lo largo de la circunferencia del tubo de centrífuga se han de tener en cuenta dos factores. El primero de ellos sería el tipo de centrífuga a emplear y el segundo la forma del tubo empleado.

En cuanto a la centrífuga, se emplea una de rotor basculante para permitir la distribución celular por toda la superficie del tubo.

Por otro lado los tubos empleados para la centrifugación poseían un fondo cónico, al requerirse que la superficie donde se sitúen las células fuera horizontal, fue necesario realizar una modificación de los mismos. Para ello se procedió a rellenar los tubos con una resina epoxi (Epofix™; Electron Microscopy Sciences Ref. 1232) que endurece al mezclarse con un catalizador o “endurecedor” (Arraud *et al.*, 2014).

Tal como mostraban las instrucciones del fabricante se mezclaron 15 volúmenes de resina junto con 2 de endurecedor, y se agitó durante 3 minutos para asegurar la mezcla por completo de ambos componentes. Tras ello se rellenaron un total de 4 tubos de centrífuga con 1 mL de la mezcla preparada anteriormente, dos de los cuales servirían posteriormente de prueba. Además también se introdujo 0,5 mL en dos tubos eppendorf para en caso de disponer de una ultracentrífuga con rotor basculante que permitiera su uso, emplearlos.

Se optó por emplear dicha resina debido a su bajo grado de toxicidad y a la baja complejidad del sistema de endurecimiento ya que tras realizar la mezcla de la resina con el endurecedor esta endurece a temperatura ambiente y fragua por completo tras 48 horas.

Cuando la resina se encontraba totalmente solidificada, se procedió con el montaje de la rejilla de microscopía electrónica en el interior del tubo de centrífuga (Figura 6). Para ello, se prepararon fragmentos de papel de sellado (papel PARAFILM®) con la forma de la circunferencia del tubo con la rejilla unida. Por último, dicho conjunto fue situado sobre la resina epoxi.

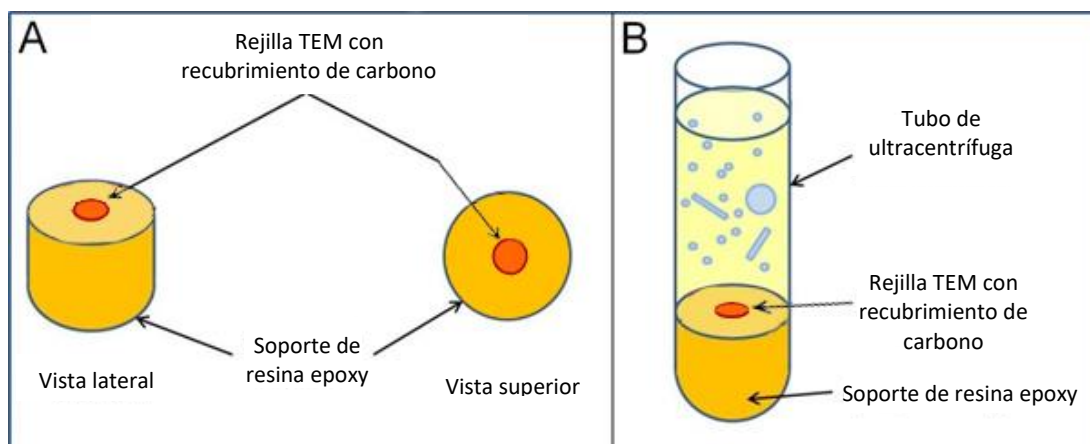


Figura 6. Esquema del procedimiento de sedimentación de OMVs en rejillas TEM (Arraud *et al.*, 2014 modificado). A) Vista lateral y superior. (B) Soporte de epoxi con cuatro rejillas EM e insertado en un tubo de ultracentrífuga.

Una vez realizado el montaje de la rejilla en el tubo de centrifuga, se pipeteó con sumo cuidado por la pared del tubo, 1 mL de las preparaciones con las células de *E. coli* B fijadas y filtradas. Y se acabó rellenando el tubo con PBS 1X filtrado a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm, hasta dejar un milímetro aproximadamente vacío. Finalmente, se equilibraron pesando los tubos y rellenando con PBS 1X (0,22 µm) la diferencia de peso.

Por último se centrifugaron los tubos, en una ultracentrífuga de rotor basculante a 6.000 g durante 20 minutos con freno lento.

2.3.2. Tinción por contraste con acetato de uranilo de *E. coli*

Para emplear el acetato de uranilo, al tratarse de una sustancia radiactiva, se debe de empapelar el área de trabajo con papel de aluminio y todos los residuos que se generen deben de tirarse en un contenedor específico para residuos radiactivos.

Primero se centrifugó durante 5 minutos la dilución de acetato de uranilo 2% y se prepararon fragmentos de papel de filtro empapados en agua mQ filtrada a 0,22 µm.

Posteriormente se colocaron las rejillas de TEM con la cara brillante para arriba enganchadas en pinzas sobre placas Petri. Y a continuación, se procedió con la tinción en sí. Para ello se pusieron 5 µL de acetato de uranilo durante 1 minuto. Tras ello se retiró el exceso con papel humedecido con agua mQ (0,22 µm) empleando pinzas. A continuación, se lavó con 5 µL de agua mQ (0,22 µm), 1 minuto. Transcurrido ese tiempo se retiró nuevamente el exceso con papel húmedo. Por último se dejó secar y se guardó correctamente identificado hasta su uso.

2.3.3. Estimación de la abundancia de *E.coli*

Finalmente las células se visualizaron en el microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1400 Plus) y para estimar la concentración celular de las muestras de microscopía se contaron las células presentes en 10 fotografías. Posteriormente en función de la escala presente en estas, se calculó la medida del ancho de las imágenes y a partir de esta el área. Tras ello, sabiendo que el diámetro del tubo de ultracentrífuga es de 3 mm, se obtuvo el área de este, siendo 153,94 mm². Con estos datos por último se obtiene el número de células por mL de la muestra ultracentrifugada.

$$N^{\circ} \text{ céls/mL} = \frac{\text{Media células}}{\text{Área observada}} \times \frac{\text{Área tubo ultracentrífuga}}{\text{Volumen centrifugado de muestra}}$$

3. Recuento de OMVs de *Vibrio coralliilyticus* mediante microscopía electrónica de transmisión

3.1. Purificación de OMVs de *Vibrio coralliilyticus*

Para separar las células de las vesículas, se realizó una primera centrifugación a 4800 g a 4°C durante 20 minutos. De esta forma se obtuvo un pellet rosado donde se encontraban las células y un sobrenadante en el que estaban las vesículas. Dicho sobrenadante, fue recogido cuidadosamente con pipeta para evitar coger células. Posteriormente este fue filtrado con un filtro de 0,22 µm mediante jeringa para quitar cualquier célula que pudiera quedar (Lindmark *et al.*, 2009; Toyofuku, 2015).

Una vez se disponía únicamente de las vesículas, se realizó una ultracentrifugación de 45 mL de sobrenadante de cultivo previamente filtrado por 0,22 µm a 36000 rpm (ultracentrífuga Beckman Coulter con rotor SW41Ti), equivalente a 221.632,5 g, durante 2 horas, a 4°C (Konoshenko *et al.*, 2018; Lindmark *et al.*, 2009). De esta forma se consiguió concentrar las vesículas en un volumen de 1 mL de buffer HEPES filtrado por un filtro de jeringa de 0,22 µm.

Seguidamente se procedió al lavado de las vesículas mediante dos tubos eppendorf con filtro de membrana de polietersulfona (PES) (10 kDa) y en cada uno de ellos se realizó el mismo tratamiento que se muestra a continuación.

Primero, se incorporaron 500 µL de las vesículas que se encuentran en buffer HEPES en los tubos y se centrifugaron a 4.800 g 20 minutos, hasta pasar por el filtro todo el volumen, descartando el líquido que había pasado. Tras ello, se realizaron 2 lavados con HEPES (0,22 µm) tal como se realizó en el paso anterior con las vesículas. Por último, las vesículas fueron resuspendidas en 500 µL de HEPES (0,22 µm) mediante un agitador tipo vórtex y recuperadas en un nuevo eppendorf.

3.2. Ultracentrifugación de OMVs de *Vibrio coralliilyticus*

En base a lo estudiado en *E. coli*, se procedió con el mismo sistema donde en el fondo del tubo de ultracentrífuga se situaba resina epoxi y sobre esta el papel parafilm junto con la rejilla de microscopía electrónica unida (Figura 6).

Se dispusieron de 3 tubos con el montaje mencionado, en los que se incorporaron diferentes muestras de OMVs. En el primero se introdujeron 500 µL de la muestra con OMVs sin lavar, en el segundo 500 µL de la muestra con OMVs lavadas y en el tercero 1 mL de la muestra con OMVs también lavadas. Dichas muestras fueron introducidas en el interior de cada uno de los tubos cuidadosamente mediante pipeteo por la pared del tubo. Tras ello, se acabaron de rellenar los tubos con buffer HEPES filtrado con un filtro de jeringa de 0,22 µm, dejando un milímetro sin

rellenar. Por último, se equilibraron los tubos pesándolos y rellenándose con HEPES (0,22 µm) la diferencia de peso.

Finalmente, se centrifugaron, en las mismas condiciones a las que se llevó a cabo la concentración de las vesículas, a 36000 rpm en una ultracentrífuga de rotor basculante Beckman Coulter con rotor SW41Ti durante 2 horas, a 4°C pero en este caso con freno lento.

En otra ocasión, se procedió de igual forma a la mencionada anteriormente, pero en este caso el parafilm con la rejilla fue adherido mediante pegamento (ZHANLIDA® B-7000) a la base de epoxi. Y en el momento de la ultracentrifugación, se realizó con una serie nueva de muestras en las que a partir del concentrado de vesículas se realizó una dilución 1/2, 1/10 y 1/100.

Por último, se prepararon varias diluciones (1/2 y 1/10) igual que se ha citado anteriormente, pegando el parafilm con pegamento a la base de epoxi. Pero esta vez, partiendo directamente del sobrenadante filtrado a 0,22 µm, sin ultraconcentrar las OMVs y lavando dos veces con membrana de PES (10 kDa) y buffer HEPES. Dicho sobrenadante se trata del mismo que posteriormente es observado mediante FE-SEM directamente del filtro de membrana de PES (10 kDa).

3.3. Tinción por contraste con acetato de uranilo de OMVs de *Vibrio coralliilyticus* y visualización en TEM

Para permitir la visualización de la muestra en el TEM, se realizó una tinción mediante acetato de uranilo de forma similar a como se procedió en *E. coli*.

Se dispusieron 5 µL de acetato de uranilo durante 1 minuto en la rejilla con la muestra. Una vez transcurrido dicho tiempo, se quitó el exceso mediante papel humedecido con agua mQ (0,22 µm). A continuación, se lavó con 5 µL de agua mQ (0,22 µm), 1 minuto. Una vez finalizado ese tiempo se retiró de nuevo el exceso con papel húmedo. Por último, se dejó secar y se guardó correctamente identificado hasta su uso.

Finalmente, para obtener la abundancia se procedió de igual forma que con las muestras de microscopía electrónica de *E. coli*.

3.4. Estimación de la abundancia de OMVs de *Vibrio coralliilyticus* por TEM

Para estimar la concentración de OMVs de las muestras de TEM se contaron en 22 fotografías. Posteriormente al igual que se realizó con *E. coli*, según la escala presente, se calculó la medida del ancho de las imágenes y a partir de esta el área. Teniendo en cuenta que el diámetro del tubo de ultracentrífuga es de 3 mm, su área es de 153,94 mm². Con estos datos finalmente se obtienen las OMVs por mL de la muestra ultracentrifugada.

$$\text{OMVs/mL} = \frac{\text{Media OMV}}{\text{Área observada}} \times \frac{\text{Área tubo ultracentrífuga}}{\text{Volumen centrifugado de muestra}}$$

4. Recuento de OMVs de *Vibrio coralliilyticus* mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y de barrido de emisión de campo (FE-SEM)

4.1. Purificación de OMVs de *V. coralliilyticus*

Al igual que para TEM, se llevó a cabo una primera centrifugación a 4800 g a 4°C durante 20 minutos para separar las células. Se recogió el sobrenadante y se filtró mediante un filtro de 0,22 µm con jeringa (Lindmark *et al.*, 2009; Toyofuku, 2015) obteniendo así las OMVs. Tras ello, hubo dos tratamientos de la muestra.

El primero de ellos, tenía como objetivo la visualización directa del filtro de membrana de PES (10 kDa), con las OMVs depositadas en este, en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM). Para ello se realizó una dilución 1/10 del sobrenadante filtrado con buffer HEPES (0,22 µm). Tras esto, se le realizaron tres lavados con HEPES (0,22 µm) en un filtro con membrana de PES (10 kDa) a 500 µL de la dilución mencionada anteriormente y las OMVs presentes en el filtro fueron resuspendidas en HEPES (0,22 µm) mediante un agitador vórtex. Esta muestra a su vez se empleó para citometría de flujo por lo que para eliminar los restos de fluoróforo se volvió a lavar 3 veces (500 µL HEPES 0,22 µm) con un filtro de membrana de PES (10 kDa) y se resuspendió en 500 µL de HEPES (0,22 µm). Finalmente, se hicieron pasar 250 µL de muestra a través de un filtro con membrana de PES (10 kDa), descartando el líquido y recuperando el filtro con las OMVs para su posterior tratamiento y visualización en el FE-SEM (ZEISS Merlin VP Compact).

En cuanto a la otra muestra, 1 mL de sobrenadante filtrado fue lavado dos veces con HEPES (0,22 µm) mediante tubos eppendorf con filtros de membrana de PES (10 kDa) y las OMVs del filtro se resuspendieron en HEPES (0,22 µm) con un agitador vórtex. Esta suspensión es la que se visualizaría en SEM (JEOL JSM-840) y FE-SEM (ZEISS Merlin VP Compact).

4.2. Preparación de las muestras para su visualización en el microscopio electrónico de barrido (SEM) y de barrido de emisión de campo (FE-SEM)

Las muestras se situaron en un soporte de aluminio específico para microscopía electrónica de barrido. Este a su vez, tenía un portaobjetos circular de vidrio y una cinta adhesiva de carbono donde disponer la muestra.

Para la muestra formada por las OMVs depositadas directamente sobre la membrana de PES (10 kDa), se dispuso esta directamente sobre la cinta adhesiva del soporte de microscopía.

En cuanto a las realizadas a partir de la suspensión de OMVs, primero se delimitó con un rotulador repelente de líquido (Liquid Blocker Super pap pen, Daido Sangyo Co. Ltd. Tokio, Japan) un cuadrado con un área de 2,5 cm² en dos soportes de aluminio. En dicha área, una vez estaba seco el rotulador se dispusieron 15 µL de muestra. Finalmente se secó en estufa a 30°C.

Posteriormente los soportes con las muestras en función del microscopio empleado para su visualización fueron tratados de diferente forma.

La muestra de la membrana de PES (10 kDa) y una de las muestras de la suspensión de OMVs, fueron preparadas para el FE-SEM, por ello se les realizó un recubrimiento de carbono en vacío.

En cuanto a la otra suspensión de OMVs se preparó para su visualización en el SEM por lo que el recubrimiento en este caso fue de oro también en vacío.

4.3. Estimación de la abundancia de OMVs de *Vibrio coralliilyticus* por SEM/FE-SEM

Para obtener la concentración de OMVs de las muestras de SEM y FE-SEM se contaron una serie de fotografías. Después, al igual que con las muestras de TEM, en función de la escala presente, se calculó la medida del ancho de las imágenes y con esta el área.

Para la muestra del filtro de membrana de PES (10 kDa), habría que tener en cuenta el área de este, que sería de 0,3 cm² (PALL Laboratory, 2018).

En cuanto a las otras dos muestras donde se delimitó un área de 2,5 cm², esta sería el área total de muestra a tener en cuenta.

Con todos estos datos finalmente se obtienen las OMVs por mL de la muestra.

$$\text{OMVs/mL} = \frac{\text{Media OMV}}{\text{Área observada}} \times \frac{\text{Área total de muestra}}{\text{Volumen de muestra}}$$

Plan de trabajo

A continuación se muestra el cronograma de las actividades del trabajo, junto con su duración.

ACTIVIDAD DEL TRABAJO	MESES	Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio			
	Semana	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Reuniones con el tutor																					
Búsqueda bibliográfica																					
Redacción del trabajo																					
Preparación de cultivos bacterianos																					
Recuento y estimación de la abundancia de <i>E. coli</i> mediante microscopía óptica																					
Recuento y estimación de la abundancia de <i>E. coli</i> mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)																					
Recuento de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i> mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)																					
Recuento de OMVs de <i>Vibrio coralliilyticus</i> mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)																					
Redacción y discusión del borrador con el tutor																					
Defensa del trabajo																					

RESULTADOS

1. Abundancia mediante recuento de células de *E. coli*

1.1. Abundancia mediante recuento por microscopía óptica de células de *E. coli*

1.1.1. Células de *E. coli* fijadas con formaldehído al 4%

Se realizaron una serie de diluciones para comprobar cuál de ellas permitía un mejor recuento y en base a ella preparar las muestras destinadas al recuento por microscopía electrónica.

Los resultados del DAPI de las células fijadas con formaldehído al 4% y lavadas mediante filtros de membrana PES (10 kDa) indican que como se puede comprobar en la Figura 7 hay una alta concentración celular que impide el recuento de la dilución 1/10, por lo que se optó por realizarlo en las fotografías realizadas a la dilución 1/100 (Figura 8).

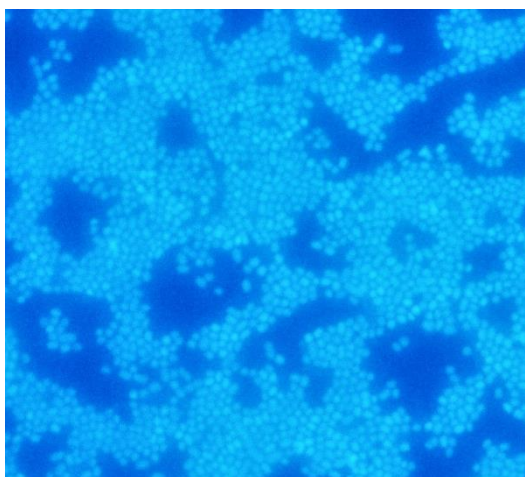


Figura 7. DAPI dilución 1/10 de células *E. coli* fijadas con formaldehído y lavadas con membrana PES (10 kDa).

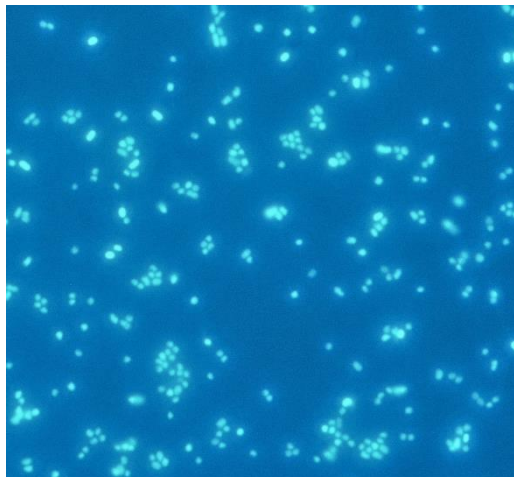


Figura 8. DAPI dilución 1/100 de células *E. coli* fijadas con formaldehído y lavadas con membrana PES (10 kDa).

Tras el recuento y una vez obtenida la media celular, se obtuvo que la concentración celular del cultivo fijado con formaldehído al 4% y lavadas mediante filtro de membrana PES (10 kDa) era de $2,80 \times 10^{10}$ células/mL. Dicho resultado sería el valor que se esperaba obtener en TEM.

1.1.2. Células de *E. coli* fijadas con glutaraldehído al 2,5%

En cuanto al DAPI del cultivo fijado con glutaraldehído al 2,5%, al igual que en el cultivo fijado con formaldehído al 4% la dilución 1/10 tal como se puede observar en la Figura 9 no permite un adecuado recuento debido a su alta concentración celular. Por ello, se empleó la dilución 1/100 (Figura 10) para realizar las fotografías en el microscopio de fluorescencia y proceder posteriormente con el recuento.

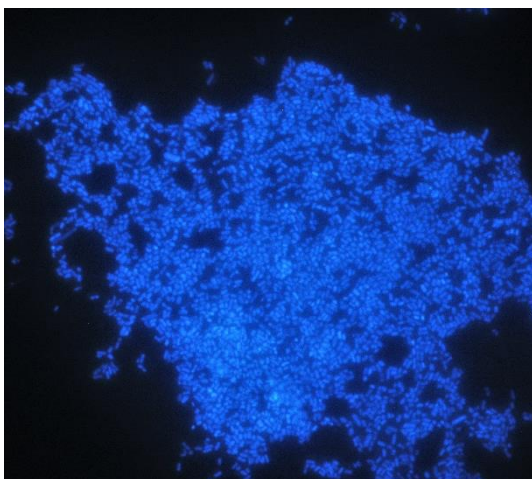


Figura 9. DAPI dilución 1/10 de células *E. coli* fijadas con glutaraldehído.

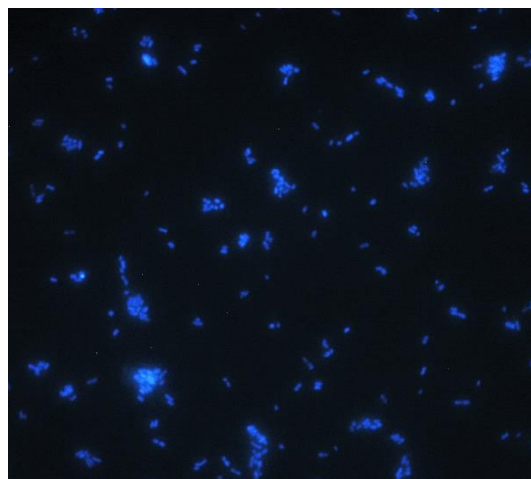


Figura 10. DAPI dilución 1/100 de células *E. coli* fijadas con glutaraldehído.

Tras obtener la media de las células, se calculó la concentración igual que en el caso anterior. Se obtuvo que la abundancia de esta muestra era de $1,23 \times 10^{10}$ células/mL siendo este por tanto el valor esperado en microscopía electrónica.

Observando los resultados obtenidos en ambos DAPI, se puede llegar a la conclusión de que la dilución 1/100, es decir, aquella que ajustaba los cultivos a 10^8 células/mL, es la óptima para proceder con el recuento en microscopía óptica. En base a ello, se concluyó que dicha concentración serviría también para el recuento en las muestras de microscopía electrónica.

Por otro lado, observando la totalidad de las imágenes, se puede observar que en las muestras fijadas con glutaraldehído se producen mayores agregaciones celulares que pueden dificultar el recuento, por lo que la fijación con formaldehído en este aspecto tendría mejores resultados.

1.2. Abundancia mediante recuento por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de células de *E. coli*

1.2.1. Células de *E. coli* fijadas con formaldehído al 4%

A las células fijadas con formaldehído al 4% y lavadas mediante filtro de membrana PES (10 kDa) se les realizaron tres diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) antes de ser depositadas en las rejillas de microscopía. Estas diluciones fueron realizadas basándose en la mejor dilución para recuento obtenida en el DAPI. No obstante, se realizaron dos más con el fin de obtener aquella en la que se permitiese un correcto recuento celular y así en posteriores preparaciones si fuera necesario, ya se sabría el número de células a partir del cual se puede considerar que el recuento puede llevarse a cabo con una mayor facilidad.

La dilución 1/10, teóricamente presentaría $2,80 \times 10^9$ células/mL, tal como se puede observar en la Figura 11, la densidad celular que presenta dificulta el recuento.

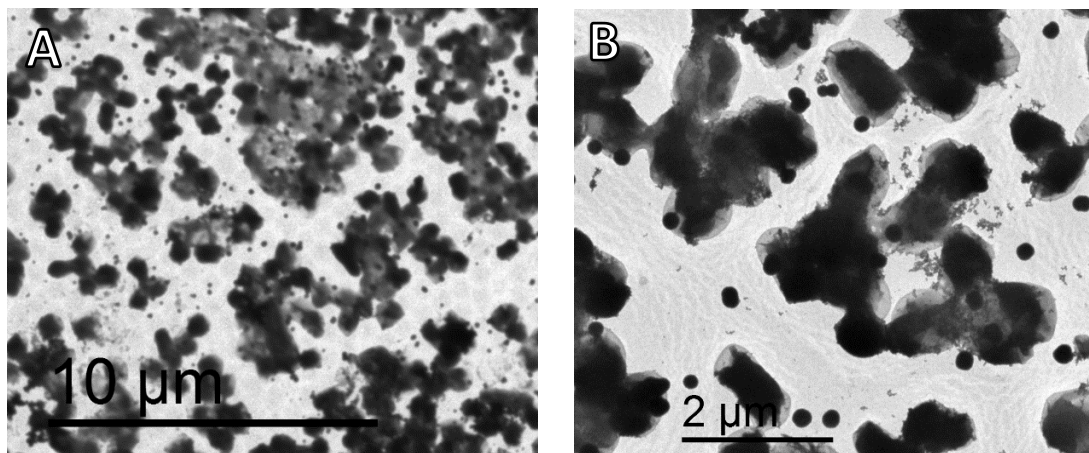


Figura 11. TEM dilución 1/10 de células *E. coli* fijadas con formaldehído y lavadas con membrana PES (10 kDa). A. Visión general x800; B. Visión detallada 1200x.

No obstante, se llevó a cabo el recuento obteniéndose que en dicha dilución habría $1,29 \times 10^8$ células/mL. Por lo tanto la concentración celular del cultivo obtenida en dicha muestra sería de $1,29 \times 10^9$ células/mL.

Por otra parte, la dilución 1/100, teóricamente tendría que tener $2,80 \times 10^8$ células/mL. En la Figura 12, en este caso, se puede realizar un recuento con mayor facilidad que con la dilución anterior aunque no obstante sigue habiendo cúmulos de células que dificultan la tarea.

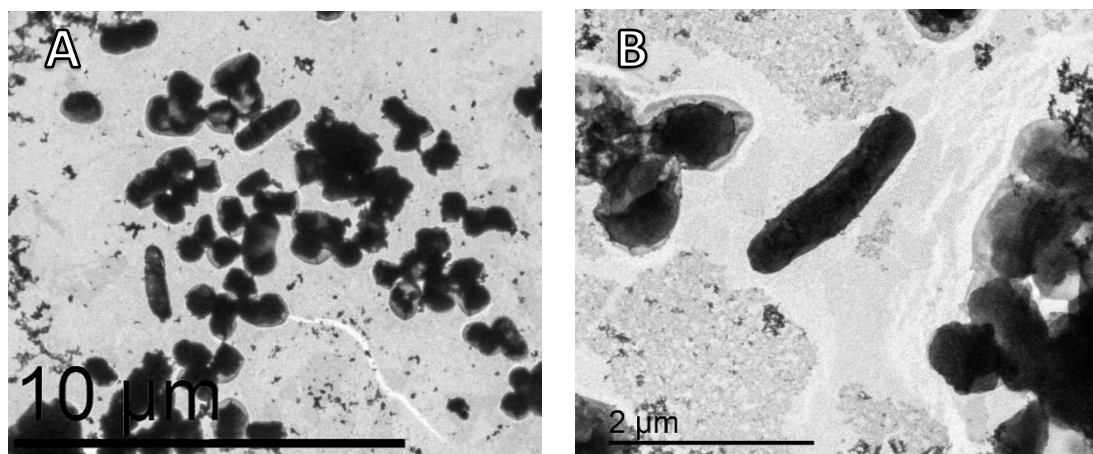


Figura 12. TEM dilución 1/100 de células *E. coli* fijadas con formaldehído y lavadas con membrana PES (10 kDa) A. Visión general x800; B. Visión detallada x1500.

Finalmente se obtuvo que la concentración de dicha dilución era de $1,46 \times 10^7$ células/mL. Con lo cual, la concentración celular del cultivo obtenida en esta otra muestra era de $1,46 \times 10^9$ células/mL.

Por último, la dilución 1/1000, se correspondería con una concentración celular teórica de $2,80 \times 10^7$ células/mL. Esta sería la que presentaría la densidad celular más adecuada para llevar

a cabo el recuento ya que como se puede comprobar en la Figura 13, las células se encuentran bien diferenciadas y apenas forman agregaciones. Por lo tanto, la concentración óptima deberá de rondar las 10^7 células/mL, cifra a la cual en posteriores pruebas se trató de ajustar la concentración celular para de esta forma llevar a cabo un adecuado recuento.

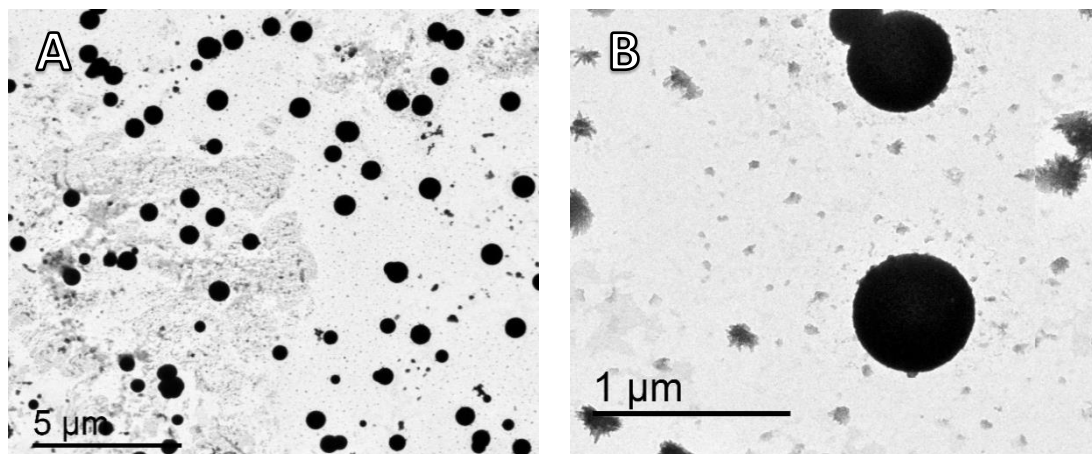


Figura 13. TEM dilución 1/1000 de células *E. coli* fijadas con formaldehído y lavadas con membrana PES (10 kDa).

Tras realizar el recuento se obtuvo que dicha dilución presentaba $5,57 \times 10^7$ células/mL. Y por lo tanto en el cultivo la concentración celular obtenida en esta última muestra es de $5,57 \times 10^{10}$ células/mL.

En la Tabla 1, se puede observar la abundancia celular en mL obtenida en las diferentes diluciones para el cultivo de *E. coli*, junto a su media. Por último se encuentra el error absoluto y experimental de estos.

Tabla 1. Recuento TEM *E. coli* fijada con formaldehído al 4% y lavada con membrana PES (10 kDa)

Concentración celular del cultivo de <i>E. coli</i> fijada con Formaldehído al 4%				
Dilución	1/10	1/100	1/1000	MEDIA
Valor teórico	$2,80 \times 10^{10}$ cél/mL	$2,80 \times 10^{10}$ cél/mL	$2,80 \times 10^{10}$ cél/mL	$2,80 \times 10^{10}$ cél/mL
Valor experimental	$1,29 \times 10^9$ cél/mL	$1,46 \times 10^9$ cél/mL	$5,57 \times 10^{10}$ cél/mL	$1,95 \times 10^{10}$ cél/mL
Error absoluto	$2,67 \times 10^{10}$ cél/mL	$2,65 \times 10^{10}$ cél/mL	$2,77 \times 10^{10}$ cél/mL	$8,50 \times 10^9$ cél/mL
Error relativo	95,39%	94,79%	98,93%	30,36%

Al realizar la media de las 3 muestras se obtuvo a partir de las imágenes de microscopía electrónica que la concentración del cultivo era de $1,95 \times 10^{10} \pm 8,50 \times 10^9$ células/mL.

En el gráfico de la Figura 14, se puede comprobar que la abundancia obtenida en el TEM es menor a la obtenida por microscopía óptica habiendo una subestimación de la concentración celular, concretamente del 30,36%.

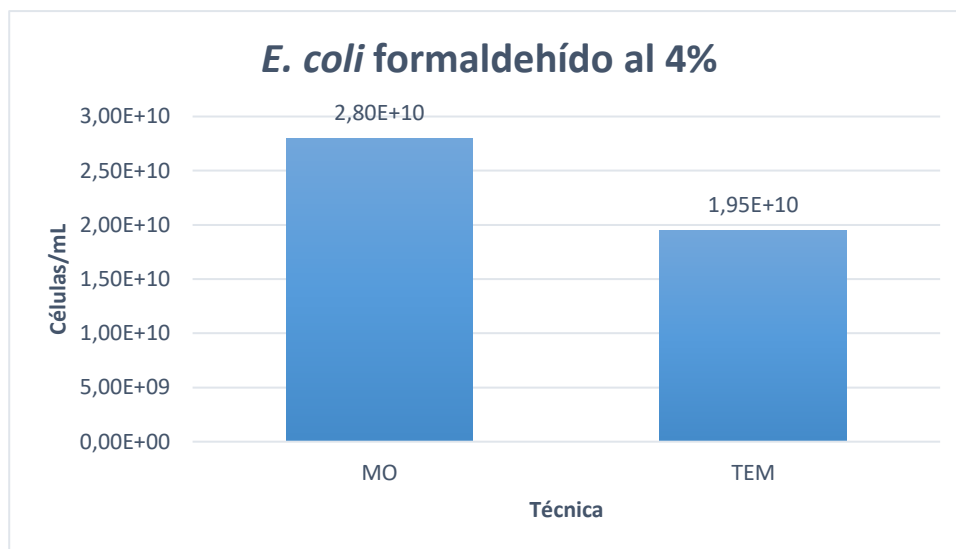


Figura 14. Gráfico comparativo de la abundancia obtenida por recuento mediante microscopía óptica (MO) y electrónica (TEM).

1.2.2. Células de *E. coli* fijadas con glutaraldehído al 2,5%

Por otro lado, los resultados del TEM pertenecientes a las células lavadas con tampón fosfato salino (PBS) 1X, posteriormente fijadas con glutaraldehído al 2,5% y lavadas también con PBS 1X que fueron depositadas en las rejillas de microscopía por ultracentrifugación, se muestran a continuación. En estas muestras, basándose en los resultados obtenidos con el formaldehído, se realizaron dos diluciones (1/1000 y 1/10000) para ajustarlas a 10^7 y 10^6 células/mL.

En la dilución 1/1000, aquella en la que teóricamente habría 10^7 células/mL, como se puede ver en la Figura 15 aparecían estructuras con formas similares a las obtenidas al fijar con formaldehído pero presentaban un tamaño mucho menor, descartando por lo tanto que se tratasen de las células de *E. coli*. Debido a ello en las muestras de dicha concentración no se pudo realizar el recuento celular.

En cuanto a la dilución 1/10000 (Figura 16) cuya concentración teórica sería de 10^6 células/mL, sí que aparecían células, pero la concentración de las mismas no era lo suficiente como para llevar a cabo un recuento adecuado.

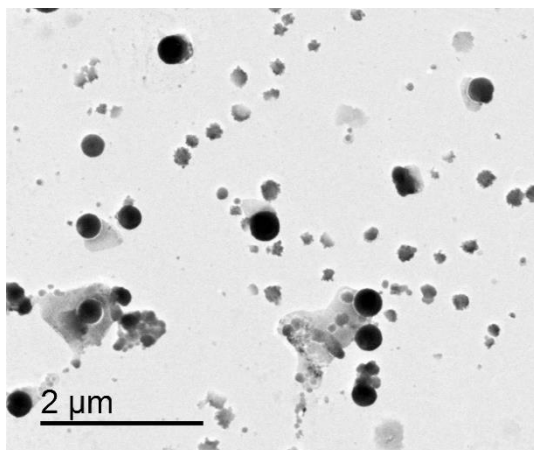


Figura 15. TEM dilución 1/1000 de células *E. coli* fijadas con glutaraldehído y lavadas con PBS 1X x1200.

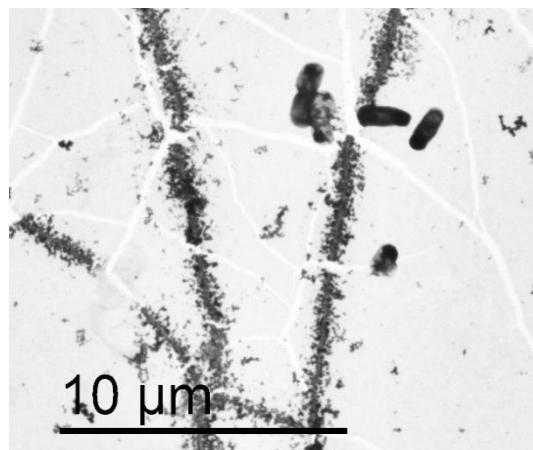


Figura 16. TEM dilución 1/10000 de células *E. coli* fijadas con glutaraldehído y lavadas con PBS 1X x300.

Al observar los resultados anteriores, se optó por realizar una serie de rejillas, en las que proceder de igual forma que se hizo en la preparación de las muestras fijadas con glutaraldehído, pero en este caso sin fijar las células. Por ello, se realizaron lavados del cultivo mediante PBS 1X de igual forma que en la muestra fijada con glutaraldehído y una vez obtenidas las células lavadas se realizó una dilución 1/1000. A partir de esta, se preparó una rejilla con 5 μ L de muestra (Figura 17) y otra rejilla que fue ultracentrifugada empleando la metodología ya mencionada anteriormente (Figura 18). Con esto, se pretendía observar si se produce cierta pérdida celular al emplear la ultracentrifugación que pueda haber hecho que en las muestras fijadas con glutaraldehído observadas en el TEM apenas apareciesen células.

Como se puede observar en las Figuras 17 y 18, aparecen células pero debido al alto grado de suciedad que se presenta en la muestra no es posible realizar recuento en ninguna de las dos muestras.

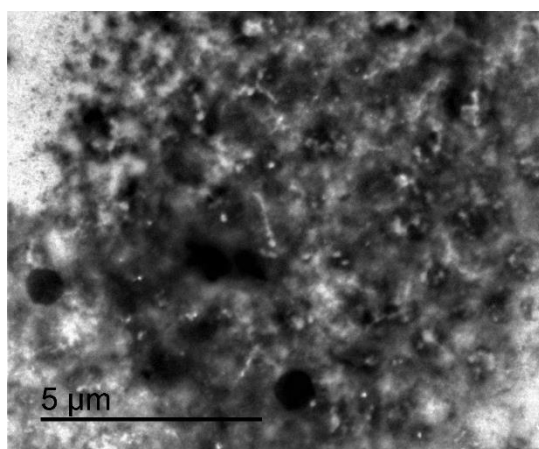


Figura 17. TEM dilución 1/1000 de células *E. coli* lavadas con PBS 1X directo en rejilla. x800.

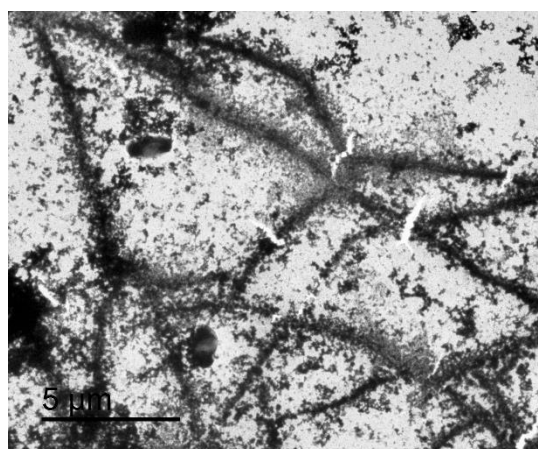


Figura 18. TEM dilución 1/1000 de células *E. coli* lavadas con PBS 1X. X500.

2. Abundancia mediante recuento por Microscopía Electrónica de OMVs de *Vibrio coralliilyticus*

2.1. Abundancia de OMVs mediante recuento por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Tras la ultracentrifugación únicamente se pudieron recuperar las rejillas que contenían 500 μL y 1 mL de vesículas lavadas.

En la muestra con 500 μL (Figura 19) se podían observar vesículas pero no suficientes como para realizar un recuento. Por otro lado, en la de 1 mL (Figura 20), tampoco fue posible el recuento debido a la alta concentración de vesículas y suciedad presentes.

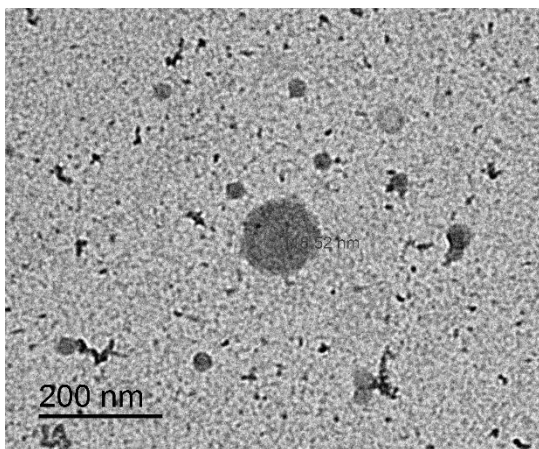


Figura 19. TEM 500 μL OMVs *V. coralliilyticus*. lavadas con membrana PES (10 kDa). x12.000.

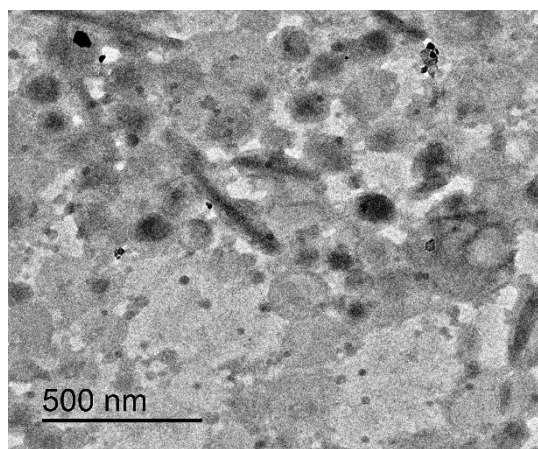


Figura 20. TEM 1 mL OMVs *V. coralliilyticus*. lavadas con membrana PES (10 kDa). x6.000.

En base a los resultados anteriores, tal como se ha expuesto anteriormente en el apartado de la metodología, se repitió dicho experimento uniendo el parafilm con la rejilla a la base de EPOXI mediante pegamento. De este modo, se consiguió recuperar las 3 preparaciones en perfecto estado ya que estas se encontraban tras la ultracentrifugación en el fondo del tubo unidos a la base. Tras ello, se recuperaron las rejillas y una vez teñidas se procedió a su observación en el TEM y posterior recuento en las muestras que lo permitieron.

La muestra que presentaba una dilución 1/2, tenía una alta concentración de vesículas impidiendo el recuento de las mismas. En el caso de la dilución 1/10 hay una ligera disminución del número de estas por lo que tampoco se pueden contar.

A partir de las imágenes obtenidas de la dilución 1/100 (Figura 21), que era la concentración con una menor densidad de vesículas, se realizó el recuento de las mismas en 22 fotografías.

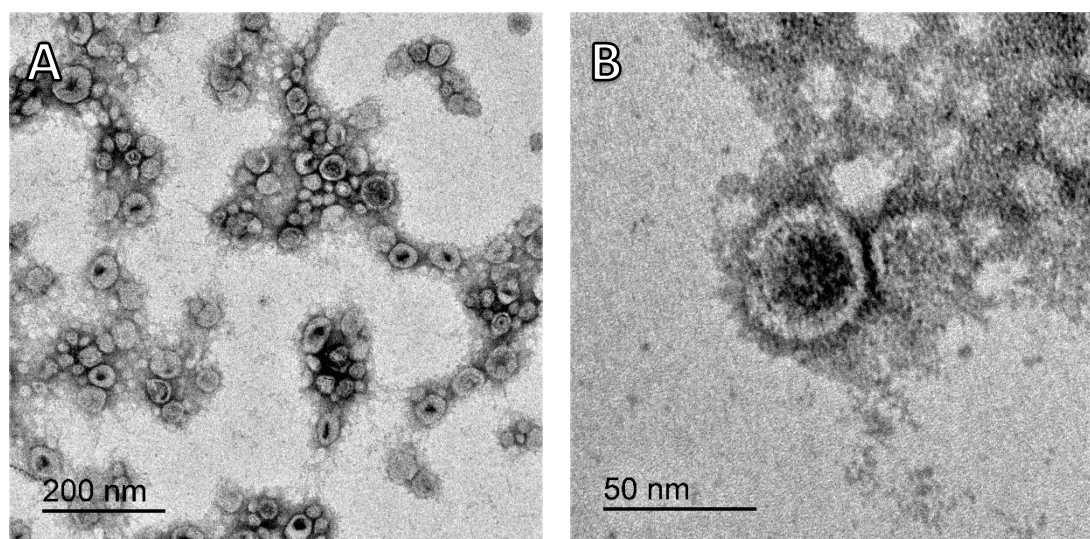


Figura 21. TEM OMVs *V. coralliilyticus* 1/100 lavadas con membrana PES (10 kDa) A. x12.000; B. x60.000.

Empleando la fórmula mencionada anteriormente, se obtuvo que la concentración de dicha muestra era de $5,94 \times 10^{11}$ OMVs/mL. Al encontrarse las vesículas concentradas, la concentración del cultivo original por tanto sería $1,19 \times 10^{10}$ OMVs/mL.

Finalmente, como se ha descrito anteriormente, se visualizó la muestra en la que las OMVs no fueron ultraconcentradas.

En la dilución 1/2 se observa una distribución desigual, donde aparecen zonas con una alta saturación y otras con una baja concentración de OMVs. Por ello, esta fue descartada para llevar a cabo el recuento.

La dilución 1/10 (Figura 22) era más homogénea y permitía un mejor recuento, por lo que este fue llevado a cabo en ella.

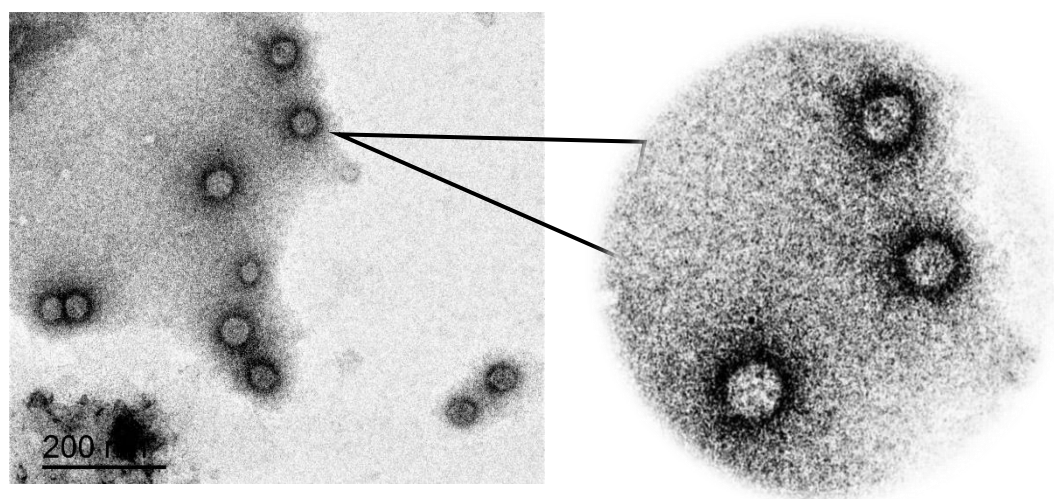


Figura 22. TEM OMVs sin ultraconcentrar *V. coralliilyticus* 1/10 lavadas con membrana PES (10 kDa). x12.000 y ampliación.

Con la fórmula citada en la metodología, se calculó la concentración de OMVs presentes en la muestra, obteniéndose que era de $3,62 \times 10^{10}$ OMVs/mL.

2.2. Abundancia de OMVs mediante recuento por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM)

En las muestras formadas por las OMVs resuspendidas en buffer HEPES no pudieron visualizarse debido a que el medio al secarse impedía verlas.

Por otro lado, estaría la muestra que contenía las OMVs lavadas con HEPES y depositadas sobre el filtro formado por una membrana de polietersulfona y un tamaño de poro de 10 kDa. Al observar esta mediante FE-SEM como se puede observar en la Figura 23, permite la visualización a la perfección de las vesículas, permitiendo su recuento incluso en planos abiertos (Figura 23A).

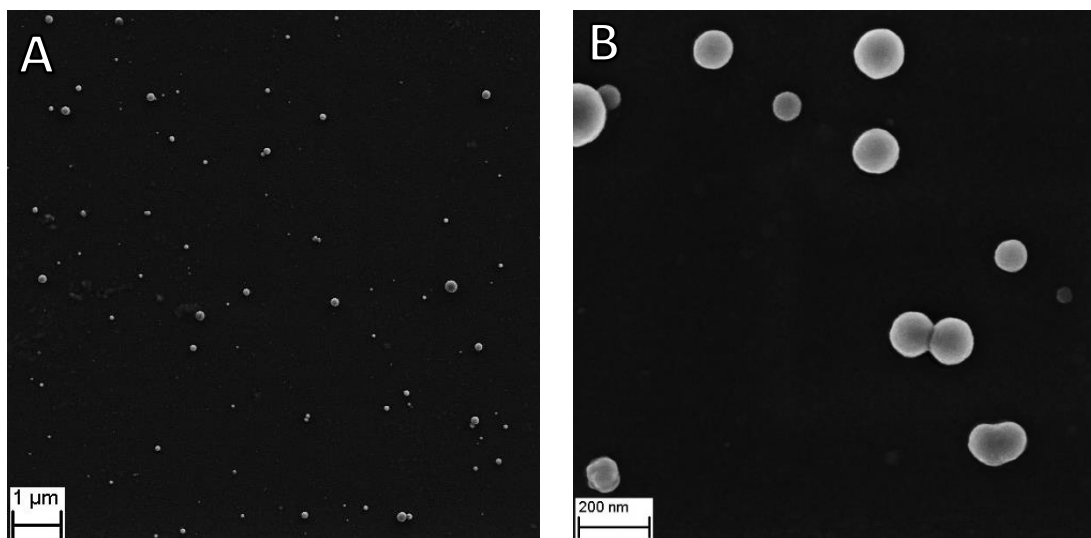


Figura 23. FE-SEM OMVs *V. coralliilyticus* 1/10 en filtro de membrana PES (10 kDa). A. x5.000; B. x50.000.

Se procedió a realizar el recuento de las imágenes y aplicando la fórmula citada en la metodología, se obtuvo que la abundancia era de $6,71 \times 10^4$ OMVs/mL.

DISCUSIÓN

1. Comparación de abundancia mediante recuento por microscopía óptica y electrónica

Tradicionalmente, la microscopía óptica se ha empleado de manera rutinaria para estimar la abundancia de bacterias. En el caso de las OMVs, dado que no se pueden observar por microscopía óptica, se necesitan de técnicas de visualización dentro del rango de resolución de la microscopía electrónica (Konoshenko *et al.*, 2018).

Para llevar a cabo el recuento de las OMVs se requiere de un método que permita su visualización, pero a su vez controlar el área y volumen de muestra. Para ello, tal como se explicó

anteriormente, se ha realizado un montaje en un tubo de ultracentrífuga con una base de epoxi y una rejilla de microscopía electrónica.

Antes de emplear dicha técnica para estimar la abundancia de OMVs, primeramente se empleó con células de *E. coli* para calibrar y optimizar esta. Para ello, paralelamente se visualizaron las células mediante microscopía óptica y tras ello con electrónica.

En microscopía óptica se pudo concluir que la dilución que permite un mejor recuento es aquella que ajustaba el cultivo a 10^8 células/mL. En otros artículos se ha observado que el óptimo para llevar a cabo el recuento de células teñidas con DAPI mediante microscopía óptica de fluorescencia es 10^7 células/mL, ya que en ese punto las células se encuentran físicamente separadas unas de otras en el filtro (Saby *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 2017). No obstante, puede que las agregaciones observadas en las preparaciones estén debidas a la fijación más que a la dilución empleada, ya que por ejemplo la muestra fijada con glutaraldehído (fijador más fuerte) (Figura 10) presenta una mayor agregación celular que la que fue fijada por formaldehído (Figura 8).

En cuanto a la microscopía electrónica en ambas preparaciones se puede comprobar la presencia de células bacterianas, no obstante la mayoría de las células fijadas con formaldehído presentan una morfología diferente, más globular (Figura 13), que las fijadas con glutaraldehído que es más bacilar (Figura 16). No obstante, puede que dicha deformación pueda ser provocada por el impacto de las células sobre la rejilla de TEM durante la centrifugación a alta velocidad. Estos resultados se tuvieron en cuenta a la hora de preparar las preparaciones de OMVs, descartando el uso de formaldehído como fijador, evitando de esta forma que las OMVs pudieran sufrir alguna deformación a causa de este. Al observar las OMVs en el TEM se pudo comprobar que estas no se deformaban a causa de la ultracentrifugación y que el uso de fijador por tanto era prescindible ya que se mantenían intactas.

En cuanto a las diferencias observadas entre las muestras cuyas células estaban fijadas con formaldehído y el resto de preparaciones (células fijadas con glutaraldehído y sin fijar) son principalmente la presencia de una mayor suciedad que no ha permitido la correcta visualización de las células y por lo tanto su recuento. Esta suciedad probablemente sea debida a como se lavaron las células, ya que los mejores resultados fueron obtenidos en las células fijadas con formaldehído al 4% que habían sido lavadas mediante filtro de membrana PES (10 kDa) y tampón fosfato salino (PBS) 1X, frente a las otras preparaciones citadas anteriormente que fueron lavadas mediante PBS 1X y centrifugación.

En base a lo observado en las células y la forma en que se lavaron, se llegó a la conclusión de que el mejor tratamiento para las OMVs sería aquel en el que se usase una membrana de PES para lavarlas con un buffer adecuado para estas.

Al lavar únicamente con PBS 1X y centrifugación, junto con la suciedad pudieron haberse perdido células, y por otro lado, al centrifugar, una mayor cantidad de restos precipitar junto con las células impidiendo posteriormente un correcto recuento. Esto en cambio al lavar con la membrana PES (10 kDa) no se produjo en tanta cantidad porque la mayoría de esos restos pasaron a través del filtro quedándose retenidas las células y una menor cantidad de suciedad en este.

Por otro lado, si se observan los resultados obtenidos de las células fijadas con formaldehído, la abundancia estimada en la microscopía óptica en el cultivo es de $2,80 \times 10^{10}$ células/mL. En cuanto a la obtenida por microscopía electrónica fue de $1,95 \times 10^{10}$ células/mL. Por tanto en dicha metodología a la hora de estimar la abundancia se observa una subestimación del 30,36%.

Esta subestimación puede ser debida a diferentes factores. Uno de ellos podría ser que durante la ultracentrifugación no todas las células fueran desplazadas hacia el fondo del tubo y algunas pudieran quedarse por las paredes de este. En cuanto a otra causa se podría encontrar la subjetividad del experimentador en el momento del recuento, donde puede en ciertas ocasiones contar como una célula lo que no lo es o pasar por alto ciertas estructuras que sí que son células pero que durante el proceso de ultracentrifugación se deformasen o lisasen.

Por estas razones, para obtener un método aún más preciso, sin subestimación, sería necesario continuar con la optimización del mismo probando con más réplicas y diferentes experimentadores que realicen el recuento. Para ello, se partiría de células, para después poder emplearlo para el recuento de OMVs. Los parámetros óptimos para llevar a cabo el recuento de las células, en el caso de la microscopía óptica tal como se observa en la Figura 8 sería una dilución que ajustara la muestra a una concentración teórica de 10^8 células/mL o tal como se observa en la bibliografía de 10^7 células/mL (Saby *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 2017). En cuanto al TEM, sería aquella dilución que ajustase las preparaciones a 10^7 células/mL (Figura 13).

2. Abundancia mediante recuento por Microscopía Electrónica de OMVs de *Vibrio coralliilyticus*

2.1. Abundancia de OMVs mediante recuento por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Tras realizar los experimentos con *E. coli* se pretendió extrapolarlo y optimizar los protocolos anteriormente citados, pero esta vez, puestos a punto con muestras de OMVs para su visualización y cuantificación.

En este punto, surgió el problema de que el tiempo y la velocidad de centrifugación necesarios para precipitar las OMVs era considerablemente mayor que los que requerían las

células de *E. coli*. Debido a ello, el montaje diseñado no acababa de ser válido puesto que las rejillas de TEM durante la ultracentrifugación en ciertas ocasiones se despegaban de la base de EPOXI. Por ello, se optó por pegar el parafilm que contenía la rejilla a la base mediante pegamento. Tras esto, las siguientes preparaciones se llevaron a cabo de forma exitosa.

En cuanto a las preparaciones de OMVs, se diferencian dos tratamientos de la muestra. El primero de ellos, sería aquel en el que las OMVs fueron ultraconcentradas, es decir, a partir del sobrenadante del cultivo de *V. coralliilyticus* filtrado por 0,22 μm y lavado con una membrana de PES (10 kDa) y buffer HEPES (0,22 μm), se concentraron las OMVs por ultracentrifugación en un volumen menor de HEPES. Por otro lado, la otra preparación se realizó de igual forma pero prescindiendo del último paso donde las OMVs son concentradas mediante ultracentrifugación, lo que disminuye considerablemente el tiempo de preparación de la muestra.

En un principio se creía necesario concentrar por ultracentrifugación. Al observar las muestras con una dilución 1/2 y 1/10, se comprobó una alta concentración de OMVs, impidiendo su correcta visualización y recuento. La dilución 1/100, donde las OMVs no se superponían, fue aquella que permitió la visualización y por tanto el recuento. Esta arrojó unos valores de abundancia de $1,19 \times 10^{10}$ OMVs/mL.

Al observar que se requería una alta dilución para llevar a cabo la observación de OMVs concentradas se llegó a la conclusión de que probablemente no era necesario concentrarlas por ultracentrifugación. En las muestras donde las OMVs no fueron concentradas, se obtuvo un valor de $3,62 \times 10^{10}$ OMVs/mL, relativamente similar al obtenido en las OMVs concentradas.

No obstante, las muestras analizadas en las preparaciones anteriores proceden de cultivos diferentes. Por ello, sería conveniente realizar a partir de un mismo cultivo una preparación sin concentrar y otra concentrando, para comprobar si realmente concentrar con ultracentrifugación es un paso prescindible, aunque aparentemente parece ser así.

Tal como se ha explicado en el apartado 1, se ha observado que con esta metodología y montaje, se produce una subestimación del 30,36% por lo tanto en los resultados de abundancia obtenidos durante el recuento de OMVs también podría darse una subvaloración similar. Si se tuviese en cuenta esta, podría decirse que realmente los valores de abundancia obtenidos de OMVs serían en el caso de la muestra de OMVs concentradas de $1,55 \times 10^{10}$ OMVs/mL y en las que estaban sin concentrar de $4,72 \times 10^{10}$ OMVs/mL.

La mayoría de bibliografía muestra la abundancia de OMVs en función de la concentración de proteínas y lípidos (Klimentová and Stulík, 2015; McCaig, Koller y Thanassi, 2012). En la poca bibliografía existente en la que se estudian las OMVs/mL se emplea para ello citometría de flujo y también medición directa de OMVs mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) (Cecil *et al.*, 2016; Gerritzen *et al.*, 2017).

El NTA es una técnica para el análisis de vesículas individuales capaz de medir el tamaño y la concentración en un medio líquido basado en el seguimiento del movimiento browniano, movimiento aleatorio que se observa en las partículas que se hallan en un medio fluido como resultado de choques contra las moléculas de dicho fluido. Emplea un láser, una cámara de video que recoge la dispersión de la luz por las partículas y el software de Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA). (Pasalic *et al.*, 2016; Malvern Panalytical, 2018).

En los estudios llevados a cabo por Cecil *et al.* (2016) en cultivos de los patógenos periodontales *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*, se empleó citometría de flujo de alta resolución. El aislamiento de las OMVs se llevó a cabo igual que en este trabajo de fin de grado, centrifugando el cultivo para separar las células, posteriormente se filtró el sobrenadante, tras ello fue ultraconcentrado y finalmente se resuspendió en buffer HEPES. Los valores de abundancia de OMVs obtenidos fueron en *P. gingivalis* de $4,98 \pm 0,77 \times 10^{12}$ OMVs/mL, *T. denticola* de $5,54 \pm 1,47 \times 10^{11}$ OMVs/mL y en *T. forsythia* de $2,00 \pm 0,65 \times 10^{12}$ OMVs/mL. Comparado con los valores obtenidos en el recuento mediante TEM de *V. coralliilyticus* donde en la muestra ultraconcentrada la abundancia fue de $1,55 \times 10^{10}$ OMVs/mL, no hay una excesiva diferencia y se tratan de valores relativamente cercanos. La diferencia puede venir dada por diferencias en la precisión de los métodos de recuento, o probablemente por tratarse de diferentes especies que habitan en hábitats totalmente dispares, aunque ambos son patógenos. Por otro lado, cabe recalcar que en el mismo estudio realizado por Cecil *et al.* (2016), entre *T. denticola* y las otras dos especies analizadas, existe una diferencia de un orden de magnitud en cuanto a la abundancia de OMVs pese a ser todos ellos patógenos periodontales. Este hecho, apoya los resultados obtenidos en este TFG donde los valores de abundancia obtenidos en *V. coralliilyticus* se separan un orden de magnitud de *T. denticola* posiblemente por las diferencias interespecíficas.

Otros estudios llevados a cabo sobre cultivos de *Bordetella pertussis* (BP536 y BP537) mediante NTA, han estimado la abundancia en $6,3 \times 10^{11}$ OMVs/mL y $6,3 \times 10^{11}$ OMVs/mL, respectivamente (Gasperini *et al.*, 2017). En este mismo estudio además se midió la abundancia a partir de la concentración de proteínas mediante el ensayo Lowry, dando el mismo número de vesículas, alrededor de 6×10^{11} OMVs. Este estudio llevó a cabo el aislamiento de igual forma a la citada anteriormente. Los valores de abundancia de *V. coralliilyticus* ($1,55 \times 10^{10}$ OMVs/mL) son bastante similares, aunque en este caso el método empleado para el recuento también es diferente al igual que el microorganismo estudiado, por lo que las diferencias pueden deberse a ello.

2.2. Abundancia de OMVs mediante recuento por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM)

En las muestras en las que las OMVs fueron resuspendidas en el tampón HEPES no fue posible visualizar nada puesto que al secarse la preparación, todo sedimentó, incluido los componentes de la propia solución que contenía las OMVs. Fue empleado HEPES porque es un buffer que mantiene en condiciones óptimas las OMVs, pero para poder llevar a cabo su visualización debería usarse un disolvente libre de componentes que puedan precipitar como agua ultrapura (mQW) para resuspender las OMVs.

No obstante, se ha podido comprobar que no haría falta resuspender ya que es posible poner directamente el filtro de membrana PES (10 kDa) empleado para el lavado de las OMVs. Lo bueno de ello es que la mayoría de componentes del medio eluyen a través del filtro y en este prácticamente únicamente quedan retenidas las OMVs, quedando una preparación muy limpia y perfecta para llevar a cabo recuento.

En la preparación de FE-SEM se obtuvieron unos valores de abundancia de $6,71 \times 10^4$ OMVs/mL.

2.3. Comparación de abundancia de OMVs mediante recuento por TEM y FE-SEM

En cuanto al cultivo donde las OMVs no fueron concentradas por ultracentrifugación, es decir, aquel que fue centrifugado para separar las células, filtrado a $0,22 \mu\text{m}$ y lavado con HEPES y una membrana de PES; fue usado para realizar una preparación para TEM y la preparación de FE-SEM en la cual fue observado directamente el filtro de membrana PES (10 kDa).

La muestra de FE-SEM sufrió una mayor manipulación y lavados con membrana PES, concretamente se realizaron sobre esta 4 lavados más con el filtro de membrana PES que la muestra de TEM. Teniendo en cuenta que el fabricante propone que las recuperaciones normalmente son mayores al 90% (PALL Laboratory, 2018), si se considerasen que las pérdidas de OMVs fuesen del 10%, en realidad en las muestras de FE-SEM la abundancia sería de $6,71 \times 10^8$ OMVs/mL en lugar de $6,71 \times 10^4$ OMVs/mL como se estimó en un principio. Lo que sería un valor más cercano al obtenido en TEM ($4,72 \times 10^{10}$ OMVs/mL) pero sigue siendo mucho menor.

En estudios donde el recuento fue llevado a cabo mediante NTA sobre cultivos de *Neisseria meningitidis*, donde las OMVs fueron aisladas por filtración y concentradas por filtración tangencial, se han obtenido valores de $9,07 \times 10^8$ OMVs/mL con un coeficiente de variación (CV) del 14% y de $8,63 \times 10^8$ OMVs/mL con un CV del 6% (Gerritzen *et al.*, 2017). Si se observan estos, son bastante similares a los obtenidos en el recuento de las OMVs de *V. coralliilyticus* por FE-SEM ($6,71 \times 10^8$ OMVs/mL). No obstante, tanto las metodologías llevadas a cabo para estimar la abundancia como el microorganismo estudiado, son diferentes. Además, *N. meningitidis* se trata

de un coco frente a *V. coralliilyticus* que es un vibrio, por lo que debido a su morfología la producción de OMVs también se puede ver afectada. Pese a ello, que dichos valores sean parecidos sirven para orientar el estudio y comprobar que probablemente no se desvía mucho de la realidad.

Por lo tanto llegado a este punto habría que sopesar si en la metodología que permite una mejor visualización y requiere menos manipulación, el FE-SEM, se produce una subestimación o si en el TEM se da una sobrestimación.

No obstante, también habría que tener en cuenta que podría caber la posibilidad de que entre las vesículas contadas en las muestras de TEM pudieran encontrarse virus con morfología y tamaño similares que hicieran que hubiera esa cierta sobrestimación de la abundancia de OMVs propuesta anteriormente.

Para preparaciones posteriores sería interesante realizar paralelamente el recuento de una misma muestra, con igual tratamiento, mediante TEM y FE-SEM, estimando finalmente la abundancia de OMVs de un cultivo.

Finalmente, para tener una mayor significación estadística faltaría además repetir el experimento varias veces más y probarlo con otras muestras de diferentes orígenes y microorganismos, por ejemplo, muestra natural.

Para concluir, cabe recalcar que a día de hoy no existe ninguna técnica estandarizada que permita llevar a cabo recuento de OMVs de forma rutinaria aportando una significación estadística suficiente. Por ello este estudio, ha buscado encontrar una técnica que lo permita, aunque por el momento no se ha podido conseguir, se ha avanzado en la búsqueda de este, encontrando al menos un método rápido y eficaz para llevar a cabo el recuento de OMVs aunque el inconveniente que impide que pueda ser empleado de forma rutinaria es el alto coste que puede llegar a tener si es empleado a gran escala.

CONCLUSIÓN

El método empleado para el estudio de la abundancia de células de *E. coli* mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión, requiere de un perfeccionamiento que permita llegar al punto en el que la estimación sea prácticamente idéntica entre un tipo y otro de microscopía. En este TFG podemos concluir que el tratamiento óptimo para visualización y recuento por TEM de bacterias en cultivo es una muestra con 10^7 células/mL fijada mediante formaldehído al 4% y lavada con un filtro de membrana de polietersulfona con un tamaño de poro de 10 kDa y PBS 1X. Los resultados, comparados con los obtenidos por la técnica de referencia mediante microscopía óptica, indican que el TEM podría subestimar el 30,36%.

Por otro lado, en lo que respecta al estudio de la abundancia de las OMVs, el método empleado y puesto a punto en este TFG permite visualizar de manera efectiva las OMVs, aunque, igual que con bacterias, también subestima la abundancia por lo que habría que optimizarlo en investigaciones futuras.

El otro método puesto a punto y optimizado basado en FE-SEM y filtrado de OMVs en membranas de polietersulfona (10 kDa) y lavado con buffer HEPES, indica que es la forma más cómoda, rápida y efectiva para llevar a cabo la visualización.

Se trata de la mejor técnica ya que en esta membrana no se produce acumulación de compuestos o artefactos que interfieran en la visualización de OMVs. Nuestros datos de recuento muestran que también subestima, por lo que habría que continuar trabajando y optimizando el protocolo.

CONCLUSION

The method used for the study of the abundance of E. Coli cells with optical microscopy and electronic transmission, need improvement to reach that the estimation of the abundance be the same in both kinds of microscopy. In this TFG we can conclude that the optimum treatment for visualization and count with TEM of bacteria in culture is a sample with 107 cells/mL fixed with formaldehyde 4% and washed with a filter of membrane of polyethersulfone with a size of pore of 10 kDa and PBS 1X. The results, compared with the obtained with the technic of reference through optical microscopy, indicate that TEM could subestimate the 30,36%.

On the other hand, at the study of OMVs abundance, the method used and tuned-up in this TFG allows visualize effectively the OMVs, although, as with bacteria, also underestimate the abundance for this reason is necessary optimize it in future investigations.

The other method tuned-up and optimized based on FE-SEM and filtering of OMVs in membranes of polyethersulfone (10 kDa) and washed with HEPES buffer, indicates that is the most comfortable, fast and effective way to carry out the visualization.

It is the best technique because don't appear accumulation of compounds and artifacts that interfere in the visualization of OMVs. Our counting data shows that also subestimate, so we should continue working and optimizing the protocol.

REFERENCIAS

- Aldick T, Bielaszewska M, Uhlin BE, Humpf HU, Wai SN, Karch H. (2009) Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin. *Molecular Microbiology* 71:1496–508.
- Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet J, Mornet S and Brisson A. (2014) Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12(5):614-627.
- Berleman J, Auer M. (2013) The role of bacterial outer membrane vesicles for intra- and interspecies delivery. *Environmental Microbiology* 15:347–354.
- Beveridge TJ. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* 181:4725–4733.
- Beveridge TJ, Makin SA, Kadurugamuwa JL, Li Z. (1997) Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiology Letters* 20:291–303.
- Biller S, Schubotz F, Roggensack S, Thompson A, Summons R, Chisholm S. (2014) Bacterial Vesicles in Marine Ecosystems. *Science* 343(6167):183-186.
- Bomberger J, MacEachran D, Coutermarsh B, Ye S, O'Toole G and Stanton B. (2009) Long-Distance Delivery of Bacterial Virulence Factors by *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles. *PLoS Pathogens* 5(4):1000382.
- Bottero D, Gaillard ME, Errea A, Moreno G, Zurita E, Pianciola L. (2013) Outer membrane vesicles derived from *Bordetella parapertussis* as an acellular vaccine against *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* infection. *Vaccine* 31:5262–8.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–54.
- Brandtzaeg P, Bryn K, Kierulf P, Ovstebø R, Namork E, Aase B and Jantzen E. (1992) Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy. *Journal of Clinical Investigation* 89(3):816-823.
- Brownlee Z, Lynn K, Thorpe P and Schroit A. (2014) A novel “salting-out” procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *Journal of Immunological Methods* 407:120-126.
- Camacho AI, de Souza J, Sánchez-Gómez S, Pardo-RosM, Irache JM, Gamazo C. (2011) Mucosal immunization with *Shigella flexneri* outer membrane vesicles induced protection in mice. *Vaccine* 29:8222–9.
- Campoy I, Lanau L, Altadill. (2016) Exosome-like vesicles in uterine aspirates: A comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols. *Journal of Translational Medicine* 14(1):180.

Carson F, Christa H. (2009). Histotechnology: a self-instructional text. American Society for Clinical Pathology Press. 3 Edition.

Cecil J, O'Brien-Simpson N, Lenzo J, Holden J, Chen Y, Singleton W, Gause K, Yan Y, Caruso F and Reynolds E. (2016) Differential Responses of Pattern Recognition Receptors to Outer Membrane Vesicles of Three Periodontal Pathogens. *PLOS ONE* 11(4):e0151967.

Chatterjee S, Das J. (1967) Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *Journal of General Microbiology* 49:1-11.

Choi DS, Yang JS, Choi EJ, Jang SC, Park S, Kim OY. (2012) The protein interaction network of extracellular vesicles derived from human colorectal cancer cells. *Journal of Proteome Research* 11:1144–51.

Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. (2014) Proteomics of extracellular vesicles: exosomes and ectosomes. *Mass Spectrometry Reviews* 34: 474–490.

Crescitelli R, Lässer C, Szabó T, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, Buzás E and Lötvall, J. (2013) Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles* 2(1):20677.

Cvijetkovic A, Lötvall J and Lässer C. (2014) The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* 3(1):23111.

Deatherage BL, Cookson BT. (2012) Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes and archaea: a conserved yet under appreciated aspect of microbial life. *Infection and Immunity* 80:1948–1957.

Deregibus M, Figliolini F, D'antico S, Manzini P, Pasquino C, De Lena M, Tetta C, Brizzi M and Camussi G. (2016) Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *International Journal of Molecular Medicine* 38(5):1359-1366.

Dorward DW, Garon CF. (1990) DNA is packaged within membrane-derived vesicles of Gram-negative but not Gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1960–2.

Ellis TN, Kuehn MJ. (2010) Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74:81–94.

Epstein S and Rossel J. (1995) Methodology of in situ grazing experiments: evaluation of a new vital dye for preparation of fluorescently labeled bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 128:143-150.

Frias A, Manresa A, de Oliveira E, López-Iglesias C, Mercade E. (2010) Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted Antarctic bacteria. *Microbial Ecology* 59:476–486.

Fulsundar S, Harms K, Flaten GE, Johnsen PJ, Chopade BA, Nielsen KM. (2014) Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Applied and Environmental Microbiology* 80:3469–83.

Gámez-Valero A, Monguió-Tortajada M, Carreras-Planella L, Franquesa M, Beyer K and Borràs F. (2016) Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Scientific Reports* 6(1).

Gasperini G, Biagini M, Arato V, Gianfaldoni C, Vadi A, Norais N, Bensi G, Delany I, Pizza M, Aricò B and Leuzzi R. (2017) Outer Membrane Vesicles (OMV)-based and Proteomics-driven Antigen Selection Identifies Novel Factors Contributing to *Bordetella pertussis* Adhesion to Epithelial Cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(2):205-215.

Gerritzen M, Martens D, Wijffels R and Stork M. (2017) High throughput nanoparticle tracking analysis for monitoring outer membrane vesicle production. *Journal of Extracellular Vesicles* 6(1):1333883.

Gujrati V, Kim S, Kim SH, Min JJ, Choy HE, Kim SC. (2014) Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. *ACS Nano* 8:1525–37.

Gyorgy B, Modos K, Pallinger E, Paloczi K, Pasztoi M, Misjak P, Deli M, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgar A, Toth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A and Buzas E. (2010) Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* 117(4):39-e48.

György B, Szabó T, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel Á, Nagy G, Falus A and Buzás E. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(16):2667-2688.

He M, Crow J, Roth M, Zeng Y and Godwin A. (2014) Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. *Lab on a Chip* 14(19):3773.

Hellman J, Loisel P, Zanzot E, Allaire J, Tehan M, Boyle L, Kurnick, J and Warren H. (2000) Release of gram-negative outer-membrane proteins into human serum and septic rat blood and their interactions with immunoglobulin in antiserum to *Escherichia coli* J5. *Journal of Infectious Diseases* 181(3):1034–1043.

Hickey C, Kuhn K, Donermeyer D, Porter N, Jin C, Cameron E, Jung H, Kaiko G, Wegorzewska M, Malvin N, Glowacki R, Hansson G, Allen P, Martens E and Stappenbeck T. (2015) Colitogenic Bacteroides thetaiotaomicron Antigens Access Host Immune Cells in a Sulfatase-Dependent Manner via Outer Membrane Vesicles. *Cell Host and Microbe* 17(5):672-680.

Ismail N, Wang Y, Dakhallallah D. (2013) Macrophagemicrovesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 121(6):984–995.

Jan A. (2017) Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Frontiers in Microbiology* 8.

Kanwar S, Dunlay C, Simeone D and Nagrath S. (2014) Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *La bon a Chip* 14(11):1891-1900.

Kim DK, Kang B, Kim OY, Choi DS, Lee J, Kim SR, *et al.* (2013) EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* 2:20384.

Klimentová J and Stulík J. (2015) Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological Research* 170:1-9.

Knox K W, Vesk M, Work E. (1966) Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 92(4):1206–1217.

Knox KW, Vesk M, Work E. (1996) Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 92:1206–17.

Kojer K, Riemer J. (2014) Balancing oxidative protein folding: the influences of reducing pathways on disulfide bond formation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1844:1383–1390.

Konoshenko M, Lekchnov E, Vlassov A and Laktionov P. (2018) Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International* 2018:1-27.

Kreimer S, Belov A, Ghiran I, Murthy S, Frank D and Ivanov A. (2015) Mass-Spectrometry-Based Molecular Characterization of Extracellular Vesicles: Lipidomics and Proteomics. *Journal of Proteome Research* 14(6):2367-2384.

Kulp A, Kuehn MJ. (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual Review of Microbiology* 64:163–184.

Lee EY, Choi DS, Kim KP, Gho YS. (2008) Proteomics in Gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrometry Review* 27:535–55.

Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, Kim S. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus* derived membrane vesicles. *Proteomics* 9:5425–36.

Lindmark B, Rømpikuntal P, Vaitkevicius K, Song T, Mizunoe Y, Uhlin B, Guerry P and Wai S. (2009) Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiology* 9(1):220.

Livshits M, Khomyakova E, Evtushenko E, Lazarev V, Kulemin N, Semina S, Generozov E and Govorun V. (2015) Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports* 5:17319.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265–75.

MacDonald IA, Kuehn MJ. (2012) Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. *Research in Microbiology* 163:607–18.

Macdonald IA, Kuehn MJ. (2013) Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 195:2971–2981.

Malvern Panalytical. (2018) Análisis de seguimiento de nanopartículas. Disponible en: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis> [consulta el 2 de Junio de 2018].

Manning AJ, Kuehn MJ. (2011) Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiology* 11:258.

Maredia R, Devineni N, Lentz P, Dallo S F, Yu J, Guentzel N, Weitao T. (2012) Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. *The Scientific World Journal* 2012:402919.

Mashburn LM, Whiteley M. (2005) Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437:422–5.

McBroom AJ, Johnson AP, Vemulapalli S, Kuehn MJ. (2006) Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *Journal of Bacteriology* 188:5385–5392.

McBroom AJ, Kuehn MJ. (2007) Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology* 63:545–558.

McCaig W, Koller A and Thanassi D. (2012) Production of Outer Membrane Vesicles and Outer Membrane Tubes by *Francisella novicida*. *Journal of Bacteriology* 195(6):1120-1132.

McMahon KJ, Castelli ME, Vescovi EG, Feldman MF. (2012) Biogenesis of outer membrane vesicles in *Serratia marcescens* is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system. *Journal of Bacteriology* 194:3241–3249.

Myers CR, Nealson KH. (1988) Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* 240:1319–21.

Nieves W, Asakrah S, Qazi O, Brown KA, Kurtz J, Aucoin DP. (2011) A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine* 29:8381–9.

Nolan J and Stoner S. (2013) A trigger channel threshold artifact in nanoparticle analysis. *Cytometry Part A* 83A(3):301-305.

PALL Laboratory (2018). Nanosep® and Nanosep MF Centrifugal Devices - Protein Fractionation. [online] Shop.pall.com. Available at: <https://shop.pall.com/us/en/laboratory/protein-sample-prep-detection/protein-fractionation/nanosep-and-nanosep-mf-centrifugal-devices-zidgri78m16> [Accessed 20 May 2018].

Pasalic L, Williams R, Siupa A, Campbell H, Henderson M and Chen V. (2016). Enumeration of extracellular vesicles by a new improved flow cytometric method is comparable to fluorescence mode nanoparticle tracking analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine* 12(4):977-986.

Pirbadian S, Barchinger SE, Leung KM, Byun HS, Jangir Y, Bouhenni RA. (2014) *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:12883–8.

Rabaey K, Rozendal RA. (2010) Microbial electrosynthesis revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology* 8:706–16.

Ricci V, Chiozzi V, Necchi V, Oldani A, Romano M, Solcia E. (2005) Free-soluble and outer membrane vesicle-associated VacA from *Helicobacter pylori*: two forms of release, a different activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337:173–8

Roden JA, Wells DH, Chomel BB, Kasten RW, Koehler JE. (2012) Hemin binding protein C is found in outer membrane vesicles and protects *Bartonella henselae* against toxic concentrations of hemin. *Infection and Immunity* 80:929–942.

Rumbo C, Fernandez-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemother* 55:3084–90.

Saby S, Sibille I, Mathieu L, Paquin J L and Block J C. (1997) Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). *Applied and Environmental Microbiology* 63(4):1564–1569.

Santana S, Antonyak M, Cerione R and Kirby B. (2014) Microfluidic isolation of cancer-cell-derived microvesicles from heterogeneous extracellular shed vesicle populations. *Biomedical Microdevices* 16(6):869-877.

Schertzer JW, Boulette ML, Whiteley M. (2009) More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends in Microbiology* 17:189–95.

Schooling SR, Hubley A, Beveridge TJ. (2009) Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* 191:4097–102.

Schwechheimer C and Kuehn M. (2015) Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology* 13(10):605-619.

Schwechheimer C, Sullivan CJ, Kuehn MJ. (2013) Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry* 52:331–340.

Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:a000414.

Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology* 10:1470–6.

Soler N, Marguet E, Verbavatz JM, Forterre P. (2008) Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales. *Research in Microbiology* 159:390–9.

Tashiro Y, Sakai R, Toyofuku M, Sawada I, Nakajima-Kambe T, Uchiyama H and Nomura N. (2009) Outer membrane machinery and alginate synthesis regulators control membrane vesicle production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 191(24):7509–7519.

Taylor D and Shah S. (2015) Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods* 87:3-10.

Taylor D, Zacharias W and Gercel-Taylor. (2011) Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling. *Methods in Molecular Biology* 728:235–246.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. (2006) Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology* 3(1):3-22.

Toyofuku M, Zhou S, Sawada I, Takaya N, Uchiyama H and Nomura N. (2013) Membrane vesicle formation is associated with pyocin production under denitrifying conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1. *Environmental Microbiology* 16:2927–2938.

Toyofuku, M, Tashiro Y, Hasegawa Y, Kurosawa M and Nomura N. (2015) Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. *Advances in Colloid and Interface Science* 226:65-77.

van den Dobbela GP, van Dijken HH, Pillai S, van Alphen L. (2007) Immunogenicity of a combination vaccine containing pneumococcal conjugates and meningococcal PorA OMVs. *Vaccine* 25:2491–6.

Van Der POL E, Van GEMERT M, STURK A, NIEUWLAND R and Van LEEUWEN T. (2012) Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 10(5):919-930.

- Vernikos G, Medini D. (2014) Bexsero(R) chronicle. *Pathogens and Global Health* 108:305–16.
- Voegel TM, Warren JG, Matsumoto A, Igo MM, Kirkpatrick BC. (2010) Localization and characterization of *Xylella fastidiosa* hemagglutinin adhesins. *Microbiology* 156:2172–9.
- Webber J and Clayton A. (2013) How pure are your vesicles?. *Journal of Extracellular Vesicles* 2(1):1-6.
- Wolf P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology* 13:269–88.
- Wright K, Crozier L, Marshall J, Merget B, Holmes A and Holden N. (2017) Differences in internalization and growth of *Escherichia coli* O157:H7 within the apoplast of edible plants, spinach and lettuce, compared with the model species *Nicotiana benthamiana*. *Microbial Biotechnology* 10(3):555-569.
- Yaron S, Kolling GL, Simon L, Matthews KR. (2000) Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4414–20.
- Zhou L, Srisatjaluk R, Justus DE, Doyle RJ. (1998) On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 163:223–228.